Aus den Forschungslaboratorien der Schering AG,

Berlin/Bergkamen

VERGLEICHENDE STOFFWECHSELUNTERSUCHUNGEN VON CORTISOL UND CORTISOL-21-SULFAT AN DER ISOLIERT PERFUNDIERTEN RATTENLEBER SOWIE AN SCHNITTEN UND ZELLFRAKTIONEN DER RATTENLEBER

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der
medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Jutta Gensch
Herzberg/Elster

1973

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552709_0008

Aus den Forschungslaboratorien der Schering AG,

Berlin/Bergkamen

VERGLEICHENDE STOFFWECHSELUNTERSUCHUNGEN VON CORTISOL UND CORTISOL-21-SULFAT AN DER ISOLIERT PERFUNDIERTEN RATTENLEBER SOWIE AN SCHNITTEN UND ZELLFRAKTIONEN DER RATTENLEBER

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der
medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Jutta Gensch
Herzberg/Elster

Referent: Prof. Dr. Dr. Gerhards
Korreferent: Prof. Dr. v. Bruchhausen

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Promoviert am:

10. AUG. 1973
UNIV. LEIDEN BIBL.

Inhaltsverzeichnis Seite

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	5
2.1	Reagenzien	5
2.2	Versuchstiere	6
2.3	Puffer und Lösungen	6
2.4	Quantitative Bestimmung der Ketolseitenkette im Cortisol	7
2.5	Quantitative Bestimmung des Schwundes der Δ^4-3-Ketogruppe	7
2.6	Papierchromatographie	7
2.7	Papierelektrophorese	8
2.8	Quantitative Bestimmung der radioaktiven Verbindungen	8
2.9	Charakterisierung der aufgetrennten Verbindungen	8
2.10	Sulphatasespaltung	9
2.11	Perfusionsversuche	9
2.11.1	Operation	9
2.11.2	Perfusionsmedium	13
2.11.3	Perfusionsbedingungen	13
2.11.4	Perfusionsablauf	13
2.11.5	Perfusionsanlage	14
2.12	Aufarbeitung des Perfusionsmediums zur quantitativen Bestimmung der Ketolseitenkette und des Schwundes der Δ^4-3-Ketogruppe	15
2.13	Aufarbeitung des Perfusionsmediums mit 7-^{3}H-Cortisol	15
2.14	Aufarbeitung des Perfusionsmediums mit 6.7-^{3}H-Cortisol-21-sulfat	15
2.15	Versuche mit Leberschnitten	17
2.15.1	Aufarbeitung der Inkubationsansätze mit Leberschnitten	17
2.16	Versuche mit Mikrosomenpräparationen	18
2.16.1	Aufarbeitung der Inkubationsansätze mit Mikrosomen	18
2.17	Versuche mit Cytoplasma	18
2.17.1	Aufarbeitung der Inkubationsansätze mit Cytoplasma	19
2.18	Abkürzungen	19

3 Ergebnisse 20
3.1 Untersuchungen zum Stoffwechsel von Cortisol und Cortisol-21-sulfat an der isoliert perfundierten Leber weiblicher Ratten 20
3.1.1 Substratabhängigkeit des Cortisol-Stoffwechsels bei Perfusion der isolierten Leber weiblicher Ratten mit steigenden Cortisolkonzentrationen 20
3.1.2 Zeitlicher Verlauf des Cortisol-Stoffwechsels an der isoliert perfundierten Leber unbehandelter weiblicher Ratten ... 23
3.1.3 Hemmung des Cortisol-Stoffwechsels an der isoliert perfundierten Leber weiblicher Ratten durch Vorbehandlung der Tiere mit 17α-Methyl-testosteron 30
3.1.4 Zeitlicher Verlauf des Cortisol-21-sulfat Stoffwechsels an der isoliert perfundierten Leber unbehandelter weiblicher Ratten 33
3.2 Untersuchungen zum Stoffwechsel von Cortisol und Cortisol-21-sulfat durch Gewebeschnitte und Mikrosomen der Leber weiblicher Ratten sowie durch Cytoplasma der Leber männlicher Ratten 40
3.2.1 Vergleichende Untersuchungen zum Stoffwechsel von Cortisol und Cortisol-21-sulfat durch Gewebeschnitte der Leber weiblicher Ratten 40
3.2.2 Vergleichende Untersuchungen zum Stoffwechsel von Cortisol und Cortisol-21-sulfat durch Mikrosomenpräparationen der Leber weiblicher Ratten 42
3.2.3 Vergleichende Untersuchungen zum Stoffwechsel von Cortisol und Cortisol-21-sulfat im Cytoplasma der Leber männlicher Ratten 43
4 Diskussion 45
5 Zusammenfassung 51
6 Literatur 53

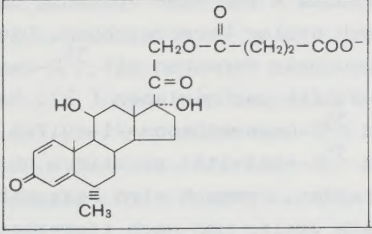
1 Einleitung

Die Konjugation der endogenen Steroide vor allem mit Glukuronsäure und Schwefelsäure führt zu gut wasserlöslichen Verbindungen, die im Gegensatz zu den nichtkonjugierten freien Steroiden rasch über die Niere und/oder die Galle eliminiert werden. Die Konjugation der endogenen Steroide ist ein wesentlicher Stoffwechselschritt, der im allgemeinen zu einer Inaktivierung der Steroide führt.

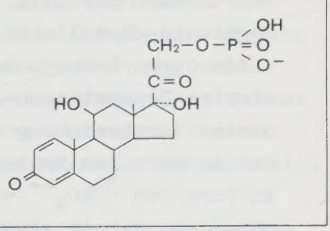
Therapeutisch werden wasserlösliche Steroidkonjugate zur i.v. Injektion benutzt. Zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit werden die Steroide z.B. mit Bernsteinsäure, Phosphorsäure oder Schwefelsäure verestert. Von dieser Möglichkeit, lipophile Steroide in wasserlösliche Verbindungen zu überführen, macht man vor allem bei Corticosteroiden Gebrauch, die therapeutisch in akuten, schweren Krankheitszuständen, wie z.B. beim kardiovaskulären Schock eingesetzt werden.

Die folgenden Formeln zeigen einige typische, therapeutisch verwendete, wasserlösliche Corticoidester.

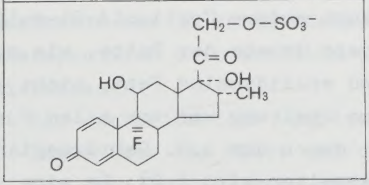
1. 6α-Methylprednisolon-21-hemisuccinat



2. Prednisolon-21-phosphat



3. Dexamethason-21-sulfat



Die therapeutisch eingesetzten wasserlöslichen Corticoidkonjugate zeichnen sich im allgemeinen dadurch aus, daß sie durch Esterasen oder Phosphatasen sehr rasch unter Freisetzung der betreffenden freien Verbindungen gespalten werden. Dies gilt z.B. für die oben angegebenen Verbindungen 1 und 2. Nach intravenöser Injektion der Verbindung 1 oder 2 sind daher tierexperimentell und beim Menschen alle erwünschten und unerwünschten systemischen Wirkungen der freien Corticoide sehr rasch nachweisbar.

In der Reihe der wasserlöslichen intravenös injizierbaren Corticoidderivate stellt das Dexamethason-21-sulfat eine Ausnahme dar. Nach intravenöser Injektion dieser Verbindung sind die typischen systemischen Wirkungen der Corticoide in geringem Maße erst bei sehr hohen Dosen nachweisbar [2]. Dies spricht für eine fehlende oder nur sehr langsame Spaltung des Corticoid-21-sulfates. Im Gegensatz zu den Untersuchungen nach i.v. Verabreichung besitzt Dexamethason-21-sulfat nach oraler Applikation tierexperimentell und beim Menschen etwa die gleiche Aktivität wie freies Dexamethason, sowohl im Hinblick auf die erwünschten als auch bezüglich der unerwünschten Corticoid-Wirkungen [2]. Diese Befunde sprechen - im Gegensatz zu den Ergebnissen der i.v. Versuche - für eine Spaltung des Corticoid-21-sulfates nach oraler Verabreichung. Dies wurde durch Untersuchungen beim Menschen mit ^{35}S-markiertem Dexamethason-21-sulfat nachgewiesen [2]. Nach oraler Verabreichung von ^{35}S-Dexamethason-21-sulfat war im Harn des Menschen ^{35}S-Aktivität praktisch nur in Form von $^{35}SO_4^{--}$ vorhanden. Demnach wird Dexamethason-21-sulfat in vivo nach oraler und nach tierexperimentellen Versuchen auch nach i.v. Verabreichung gespalten [2]. Es ist nun sehr überraschend, daß Dexamethason-21-sulfat wie auch andere Corticoid-21-sulfate in vitro durch verschiedene Gewebe der Ratte, wie z.B. Dünndarmmukosa, Leber und epididymales Fett, nicht gespalten werden [2]. Eine Spaltung war vor allem durch Lebergewebe zu erwarten, durch das z.B. Dehydroepiandrosteron-3-sulfat rasch gespalten wird [2]. Da eine Spaltung von Corticoid-21-sulfaten in vivo bereits

nachgewiesen wurde, in vitro mit Homogenaten verschiedener Gewebe bisher aber der Nachweis einer enzymatischen Spaltung nicht gelang, sollte in der vorliegenden Arbeit an der isoliert perfundierten Leber, d.h. mit intaktem Gewebe in vitro, am Beispiel des Cortisol-21-sulfates die Spaltung erneut untersucht werden. Neben diesem untergeordneten Teilaspekt sollte in dieser Arbeit in erster Linie die Frage bearbeitet werde, ob Corticoid-21-sulfate per se, d.h. ohne vorherige enzymatische Abspaltung des freien Steroids, metabolisiert werden können.

Der Stoffwechsel der freien natürlichen und synthetischen Corticoide wurde in zahlreichen Arbeiten in vivo und in vitro untersucht. Zum Stoffwechsel der Corticoid-21-sulfate liegen bisher fast keine Untersuchungen vor.

Über den Rahmen des Dexamethason-21-sulfates hinaus ist die Frage nach dem Metabolismus von C_{21}-konjugierten, wasserlöslichen Corticoidderivaten im Hinblick auf die Schocktherapie von Interesse. In zunehmendem Maße werden zur Schocktherapie 1 g und mehr der Verbindungen 1 oder 2 (s. S.1) intravenös injiziert. Diese extrem hohen Dosen legen die Annahme nahe, daß zur akuten Schocktherapie eine pharmakodynamische Wirkung des ungespaltenen Corticoid-21-esters ausgenutzt wird. Für diese Annahme spricht auch die akut einsetzende Wirkung des i.v. injizierten Dexamethason-21-sulfates beim Schock. Wegen der langsamen Spaltung dieses 21-Sulfates nach i.v. Injektion kann die akute Wirkung im Schock nicht über eine Wirkung von durch Spaltung freigesetztem Dexamethason erklärt werden.

Wenn man unterstellt, daß die akute Wirkung im kardiovaskulären Schock an das ungespaltene Corticoidkonjugat geknüpft ist, dann wären vom Gesichtspunkt der Pharmakokinetik aus im wesentlichen zwei Gründe für die therapeutisch erforderliche extrem hohe Dosierung zu diskutieren:

1. Das wasserlösliche Corticoidkonjugat wird äußerst rasch über die Niere und/oder die Galle eliminiert.
2. Das Corticoid-21-konjugat wird sehr rasch gespalten und/oder im Steroidteil metabolisiert und damit evtl.

inaktiviert.
In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob Enzyme des Steroidstoffwechsels auch konjugierte Steroide als wasserlösliche Verbindungen angreifen können. Zur Bearbeitung dieser grundsätzlichen Frage wurde mit Cortisol-21-sulfat gearbeitet, da bei Cortisolderivaten, wie z.B. beim freien Prednison oder beim freien Dexamethason bereits wesentliche Stoffwechselschritte am Ring A im Vergleich zum Cortisol gehemmt sind.
Zur Bearbeitung der prinzipiellen Frage sollte die Hydrierung des Ringes A im Steroidteil an der isoliert perfundierten Leber der Ratte sowie mit Schnitten, Mikrosomenpräparationen und Cytoplasma der Rattenleber untersucht werden. Die 20-Ketoreduktion - neben der Ring-A-Reduktion ein weiterer wesentlicher Schritt des Corticoidstoffwechsels - sollte hier nicht untersucht werden, da nach früheren Untersuchungen [7,3] die Reduktion der 20-Ketogruppe durch Veresterung der C_{21}OH-Gruppe gehemmt wird.
In den hier beschriebenen Untersuchungen mußte das Corticoid-21-sulfat vor der weiteren Analytik jeweils enzymatisch mit Sulphatase gespalten werden. Das freigesetzte Corticoid wurde dann zur Bestimmung des unveränderten Cortisols und seiner Metabolite papierchromatographisch differenziert. Zur Beantwortung der Frage, ob durch die Veresterung des Cortisols an C_{21} mit Schwefelsäure der Stoffwechsel des Ringes A qualitativ und/oder quantitativ gegenüber dem Stoffwechsel des freien Cortisols verändert wird, wurden jeweils Kontrollversuche mit freiem Cortisol durchgeführt.

2
Material und Methoden

2.1
Reagenzien

Äther, reinst (Farbwerke Hoechst AG, Frankfurt)

Alle anderen Lösungsmittel p.a. (Merck, Darmstadt)

Cortisol (Schuchardt, München)

7-^{3}H-Cortisol, spez. Akt. 77.2 µg ≙ 50 µC, (The Radiochemical Centre, Amersham, Buckinghamshire, England)

6.7-^{3}H-Cortisol-21-sulfat-Natrium, spez. Akt. wie 7-^{3}H-Cortisol (Schering AG, Berlin)

Glukose-6-phosphat, Dinatriumsalz, (G-6-P-Na_2), (Boehringer Mannheim GmbH)

Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase, (G-6-P-DH), Reinheitsgrad II, (Boehringer Mannheim GmbH)

Heparin, 1000 E/mg, (Teerchemie, Hamburg)

Isonicotinsäurehydrazid (INH) (Serva, Heidelberg)

17α-Methyl-testosteron (Schuchardt, München)

Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat ($NADP^{+}$), Dinatriumsalz, (Boehringer Mannheim GmbH)

Nembutal$^{(R)}$ (Deutsche Abbott GmbH, Ingelheim am Rhein)

Saccharose (Sucrose),reinst (Serva, Heidelberg)

Sulphatase aus Helix pomatia, 10000-15000 E/mg, (Ferak, Berlin)

Terramycin (Pfizer GmbH, Karsruhe)

Tetramethylammonium hydroxyd solutum 10 % (Merck, Darmstadt)

2.3.5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) (Merck, Darmstadt)

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, rein (Serva, Heidelberg)

2.2
Versuchstiere

Gefütterte Sprague-Dawley Ratten, Gewicht: 180-200 g, soweit nicht anders vermerkt.
Für die Perfusionsversuche sowie für die Herstellung der Leber-Mikrosomenpräparationen und der Leberschnitte wurden weibliche Tiere verwendet. Die Versuche mit Cytoplasma der Leber wurden mit männlichen Tieren durchgeführt.

2.3
Puffer und Lösungen

Krebs-Henseleit-Ringer-Phosphat-Puffer:

1000 ml 0.154 M NaCl (0.9 %) + 40 ml 0.154 M KCl (1.15%) + 30 ml 0.11 M $CaCl_2$ (1.22%) + 10 ml 0.154 M $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (3.82%) + 200 ml 0.1 M Na-Phosphatpuffer (17.8 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ + 20 ml 1 N HCl mit aqua bidest. ad 1000 ml)

Tris-Puffer

25.0 ml 0.2 M Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) + 45.0 ml 0.1 N HCl mit aqua bidest. ad 100 ml

Lösungen für TTC-Reaktion

1. 10 ml Tetramethylammonium hydroxyd 10 % mit Äthanol 95 % ad 100 ml
2. Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) 0.5 % in Äthanol 95 %

Lösung für INH-Reaktion

1 g Isonicotinsäure-Hydrazid (INH) gelöst in 2 l Methanol + 1.25 ml konz. HCl

Szintillationsflüssigkeit

Insta-Gel$^{(R)}$ (Packard Instruments, Illinois, USA)

2.4

Die quantitative Bestimmung der Ketolseitenkette im Cortisol erfolgte mit Hilfe der TTC-Reaktion nach der Methode von Schriefers et al. [12].

Zwei Stoffwechselschritte führen zu einem Schwund der Ketolseitenkette im Cortisol:

1. die Reduktion der 20-Ketogruppe
2. die Abspaltung der Ketolseitenkette unter Bildung einer 17-Ketogruppe

Mit der TTC-Reaktion wird summarisch der Schwund der Ketolseitenkette erfaßt und sie erlaubt keine Aussage zu der Frage, in welchem Ausmaß die oben genannten Reaktionen am Schwund der Ketolseitenkette beteiligt sind. Da die 20-Ketoreduktion aber gegenüber der Abspaltung der Ketolseitenkette im Stoffwechsel ganz im Vordergrund steht, kann der TTC-Schwund als Meßgröße für die 20-Ketoreduktion gelten.

2.5

Die quantitative Bestimmung des Schwundes der Δ^4-3-Ketogruppe wurde mit der INH-Reaktion nach der Methode von Weichselbaum et al. [14] durchgeführt. Mit der INH-Reaktion wird die unveränderte Δ^4-3-Ketogruppierung im Steroidmolekül erfaßt. Δ^4-3-Ketosteroide reagieren mit INH unter Bildung des bei 380 mμ absorbierenden entsprechenden Isonicotinsäurehydrazons. Die Extinktion wurde am Photometer Eppendorf bestimmt.

2.6

Papierchromatographie

Zur papierchromatographischen Auftrennung der freien Steroide wurden die in Methanol aufgenommenen Extraktrückstände auf Chromatographiepapier (Whatman Nr.1) aufgetragen. Es wurde absteigend bei 20°C 24-28 Std. chromatographiert. Als stationäre Phase diente Formamid, als Laufmittel Chloroform:Benzol (1:1, V/V).

2.7
Papierelektrophorese

Zur papierelektrophoretischen Auftrennung der Steroidkonjugate wurden die in Methanol aufgenommenen Extraktrückstände auf Elektrophoresepapier (Macherey und Nagel, Düren, Nr. 214) aufgetragen und in 2 N Essigsäure bei 3.7 V cm^{-1} getrennt. Laufzeit: 15 Std.

2.8
Quantitative Bestimmung der radioaktiven Verbindungen

Zur Lokalisierung und quantitativen Bestimmung der radioaktiven freien Steroide auf den Papierchromatogrammen sowie der radioaktiven Steroidkonjugate auf den Elektropherogrammen wurde die Radioaktivität mit Hilfe des Strahlungsmeßgerätes FH 49 A (Fa. Frieseke und Hoepfner GmbH, Erlangen-Bruck) gemessen.
Die quantitative Bestimmung der radioaktiven freien Steroide in den Äther/Chloroform Extrakten erfolgte im Tri-Carb Szintillationsspektrometer, Modell 3375, (Fa. Packard Instruments, Illinois, USA). Jeweils 0.1 ml der zu messenden Lösung wurden mit 1 ml Methanol und mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt.

2.9
Charakterisierung der aufgetrennten Verbindungen

Als authentische Vergleichssubstanzen standen zur Verfügung:

1. 11β,17α, 21-Trihydroxy 5β pregnan- 3,20 dion (Dihydrocortisol, DHF)
2. 3α, 11β, 17α, 21-Tetrahydroxy 5β pregnan- 20-on (Tetrahydrocortisol, THF)

Die im Perfusionsmedium nachweisbaren radioaktiven Verbindungen verhielten sich in Vergleichs- und Mischchromatogrammen wie die authentischen Verbindungen Cortisol, Dihydrocortisol und Tetrahydrocortisol.
Zur weiteren Charakterisierung der radioaktiven Verbindungen im Perfusionsmedium wurden diese mit Essigsäureanhydrid in Pyridin acetyliert. Nach der Acetylierung verhielten sich die Verbindungen papier-

chromatographisch wie authentisches Cortisol-21-acetat, Dihydrocortisol-21-acetat und Tetrahydrocortisol-3,21-diacetat. Im Hinblick auf die Fragestellung der vorliegenden Arbeit wurde eine weitergehende chemische Identifikation der Metabolite nicht durchgeführt.

2.10
Sulphatasespaltung

Zur enzymatischen Hydrolyse der Corticoid-21-sulfate mit Sulphatase wurde die zu untersuchende Probe mit Na-acetat (Endkonzentration 0.2 M) versetzt und mit Essigsäure auf pH =5 eingestellt. Nach Zugabe von 1500 E Sulphatase/ml wurde 24 Std. bei 37°C inkubiert.

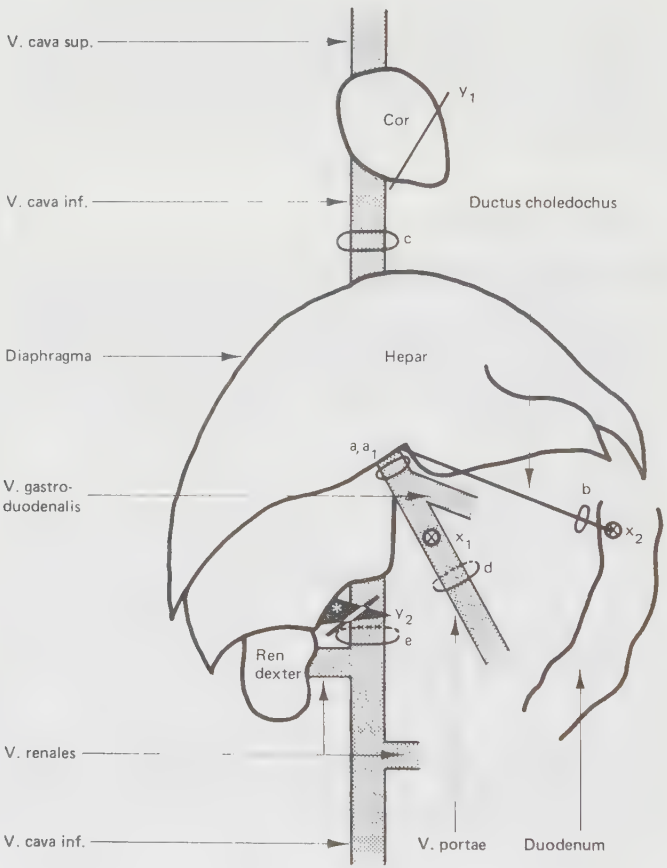
2.11
Perfusionsversuche

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Perfusionsversuche wurden in Anlehnung an die von Schriefers et al. [10] und Schimassek [6] beschriebenen Methoden durchgeführt. Wie von Schriefers et al. [10] bei seinen Untersuchungen zum Corticoid-Stoffwechsel an der isoliert perfundierten Rattenleber beschrieben, wurde auch hier mit erythrozytenfreiem Perfusionsmedium gearbeitet. Im Gegesatz zu Schriefers et al. und in Übereinstimmung mit der von Schimassek angegebenen Methode wurde die Leber über die Vena portae durchströmt.

2.11.1
Operation

Die zur Vorbereitung der Leberperfusion erforderlichen operativen Einzelschritte sind in Abb. 1 schematisch dargestellt.

Abb. 1 Operationssitus, schematische Darstellung



Ligaturen für Katheter

a Vena portae proximal der Vena gastroduodenalis

b Ductus choledochus

c Vena cava inferior

Ligaturen für Gefäßunterbindung

d Vena portae ca. 1 cm distal von a

e Vena cava inferior proximal der Vena renalis dextra

Ligaturen als Zügel

a_1 identisch mit a

Incisionen

x_1 Incision für den Pfortaderkatheter

x_2 Incision für den Ductus choledochus – Katheter

y_1 Abschneiden der Herzspitze für den Vena cava – Katheter

y_2 Durchtrennen der * bindegewebigen Verbindung zwischen rechtem Leberlappen und Vena cava inferior

Die Operationsschritte in ihrer zeitlichen Aufeinanderfolge sind im folgenden stichwortartig angegeben:

- Narkose mit intraperitonealer Injektion von Nembutal (5 mg/100 g KG)
- Eröffnen des Abdomens durch einen Median- und 2 Lateralschnitte
- Darstellen von V. portae, V. cava inf., Ductus choledochus
- Durchtrennen der bindegewebigen Verbindung zwischen rechtem Leberlappen und V. cava inf. (y_2)
- lockere Umschlingung der V. portae proximal der V. gastroduodenalis (a)
- lockere Umschlingung der V. portae ca. 1 cm distal von a (d)
- Incision des Ductus choledochus an seiner Einmündungsstelle ins Duodenum (x_2)
- Einschieben eines Katheters in den Ductus choledochus in Richtung Leber und Befestigen mit einer Ligatur (b)
- Gleichzeitiges Straffen des lebernahen Pfortaderfadens wie einen Zügel (a_1) und Festziehen des distalen Pfortaderfadens (d)
- Incision der Pfortadervorderwand zwischen den beiden Fäden (x_1)
- Einschieben eines Katheters in Richtung Leberhilus und Befestigen durch die lebernahe Ligatur (a)
- Eröffnen des Brustkorbes mit einem Querschnitt und Abtragen der Brustwand
- Abschneiden der Herzspitze (y_1)
- Einführen eines Katheters durch den rechten Vorhof bis zum Zwerchfell und Befestigen mit einer Ligatur (c)
- Festziehen der zu Beginn gelegten Umschlingung an der V. cava inf.
- Zusätzliche Fixation des Pfortaderkatheters mit dem distalen Pfortaderfaden (d)
- Säuberung des Operationsgebietes von Blut
- Bedecken des Operationsgebietes mit einem Puffer getränkten Mullläppchen und Parafilm

Die Abb. 2 zeigt das Photo eines Operationssitus nach beendeter Operation.

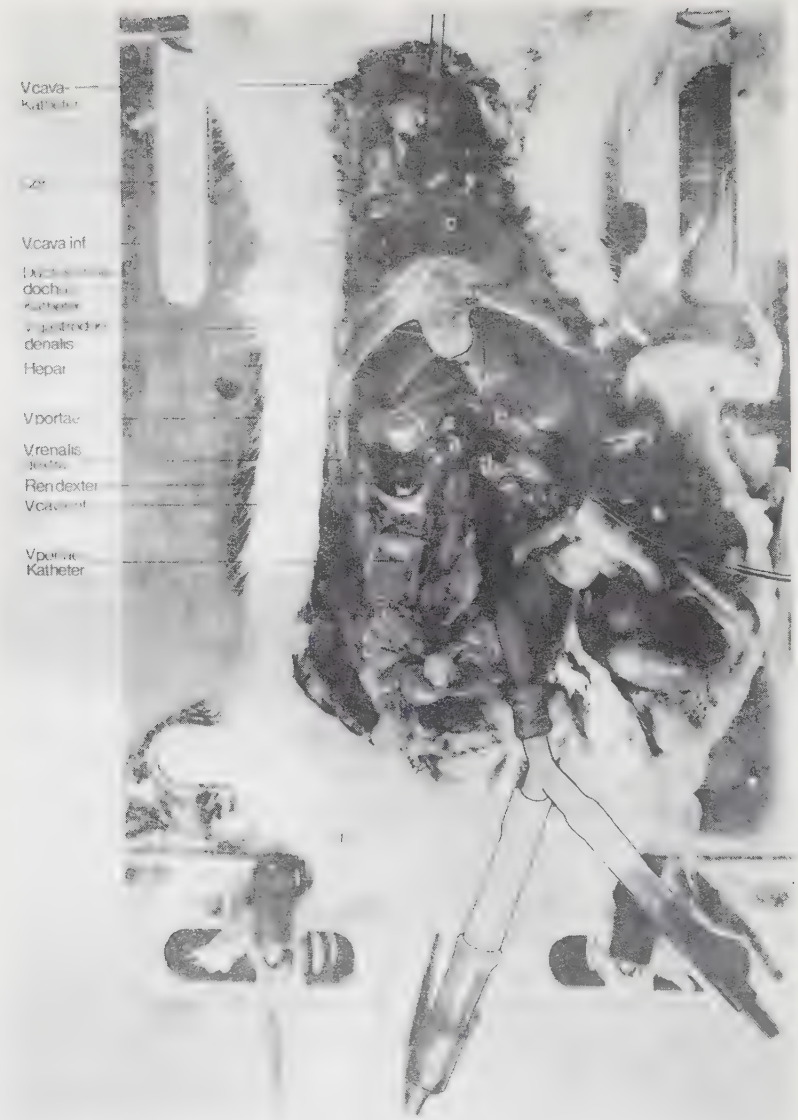


Abb.2 Photographische Darstellung eines Operationssitus

Ligaturen für Katheter

a V.portae proximal der V.gastroduodenalis
b Ductus choledochus
c V.cava inf.
d V.portae 1 cm distal

Ligatur für Gefäßunterbindung

e V.cava inf. proximal der V.renalis dextra

Incision

y Zustand nach abgeschnittener

Die Operation dauerte durchschnittlich 10 bis 15 min. Die Durchströmung der Leber begann sofort bei Einführung des Pfortaderkatheters. Die anoxämische Phase während der Umstellung von natürlicher auf künstliche Durchströmung betrug ca 5 bis 10 sec. Wenn die aus dem V.cava- Katheter austretende Flüssigkeit unblutig war, wurde die Leber über ein Y-Stück am Pfortaderkatheter an das Perfusionssystem im temperatur- und feuchtigkeitskonstanten Perfusionskasten angeschlossen. (s. Abb. 3)

2.11.2
Perfusionsmedium

Das Perfusionsmedium hatte folgende Zusammensetzung:

NaCl 795 mg/100 ml + KCl 19.84 mg/100 ml +
$CaCl_2$ 15.54 mg/100 ml + $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 9.95 mg/100 ml +
$NaHCO_3$ 100 mg/100 ml + $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 9.25 mg/100 ml +
D-Glukose·H_2O 200 mg/100 ml + Ca-Lactat 32.6 mg/100 ml +
Na-Pyruvat 1.0 mg/100 ml + Terramycin 1.5 mg/100 ml

Das Perfusionsmedium wurde 20 min vor sowie während der Perfusion mit dem Gasgemisch 95 % O_2 und 5 % CO_2 begast.
Während der Operation wurde die Leber mit heparinhaltigem Perfusionsmedium (2.5 mg Heparin/100 ml) durchströmt.

2.11.3
Perfusionsbedingungen

Bei der Perfusion wurden folgende Bedingungen eingehalten, sofern bei den einzelnen Versuchen nicht anders vermerkt: hydrostatischer Druck = 20 cm Wassersäule, Durchflußgeschwindigkeit = 1.5 ml/g Leberfeuchtgewebe/min.

2.11.4
Perfusionsablauf

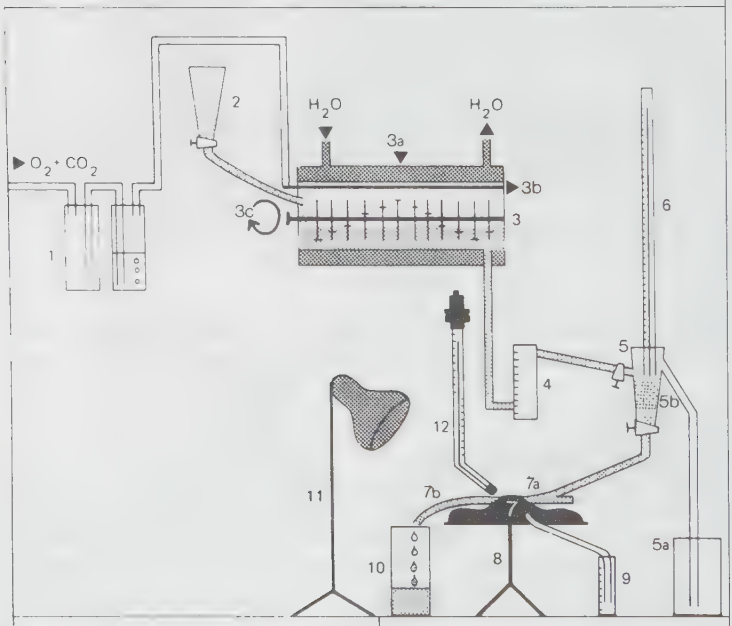
Die Perfusionen wurden im offenen System durchgeführt. Die Leber wurde in allen Versuchen zunächst vorperfundiert. Die Dauer der Vorperfusion ist bei den einzelnen Versuchen angegeben. Bei den Untersuchungen zur Substratabhängigkeit des Cortisol-Stoffwechsels in der perfundierten Leber wurde zur Hauptperfusion jeweils neues Medium mit steigenden Cortisolkonzentrationen eingesetzt.

Bei den Untersuchungen zur Zeitabhängigkeit des Cortisol-, bzw. Cortisol-21-sulfat-Stoffwechsels wurde dasselbe Medium - nach der ersten Leberpassage der Hauptperfusion und Entnahme eines aliquoten Teiles zur Analyse - für die folgenden, von einander getrennt gehaltenen Passagen verwendet (recycling im offenen System).

2.11.5
Perfusionsanlage

Die Perfusionsanlage ist schematisch in Abb.3 dargestellt.

Abb. 3 Perfusionsapparatur, schematische Darstellung



1 Sicherheits- und Befeuchtungsflasche für das Gasgemisch 95 % O_2 und 5 % CO_2

2 Reservoir für Perfusionsmedium

3 Scheibenoxygenator
a) mit Thermostatwasser durchstromter Warmemantel
b) perforierte Metalleitung zur Begasung
c) Motor

4 Flowmeter

5 Überlaufgefaß mit
a) Auffanggefaß
b) Mullfilter

6 Thermometer in Perfusionsmedium eintauchend

7 Ratte mit Leber in situ
a) Pfortaderkatheter mit Y-Stück
b) Vena cava-Katheter

8 Operationstisch

9 Auffanggefäß für Galle

10 Auffanggefäß für Perfusionsmedium

11 Heizlampe

12 Kontaktthermometer für 11

2.12

Aufarbeitung des Perfusionsmediums zur quantitativen Bestimmung der Ketolseitenkette und des Schwundes der Δ^4-3-Ketogruppe

Nach Extraktion der freien Steroide (s. 2.13) wurden mit den Extraktrückständen die TTC-Reaktion (s. 2.4) und die INH-Reaktion (s. 2.5) durchgeführt.

2.13

Aufarbeitung des Perfusionsmediums mit 7-^{3}H-Cortisol

Zur Extraktion der freien Steroide wurden aliquote Teile des Perfusionsmediums 3 mal mit gleichem Volumen Äther/Chloroform 3:1 extrahiert. Die vereinigten Äther/Chloroform Extrakte wurden über Na_2SO_4 getrocknet und bei 40°C im Vakuum zur Trockne gebracht.
Die Trockenrückstände wurden in wenig Methanol gelöst und papierchromatographisch aufgetrennt (s. 2.6).
Die radioaktiven Verbindungen auf den Papierchromatogrammen wurden quantitativ bestimmt (s. 2.8). Die Radioaktivität der einzelnen Metabolite wurde in Prozent der auf den Chromatogrammen gemessenen Gesamtradioaktivität ausgedrückt, da bei der Extraktion die Wiederfindung mehr als 95 % betrug.

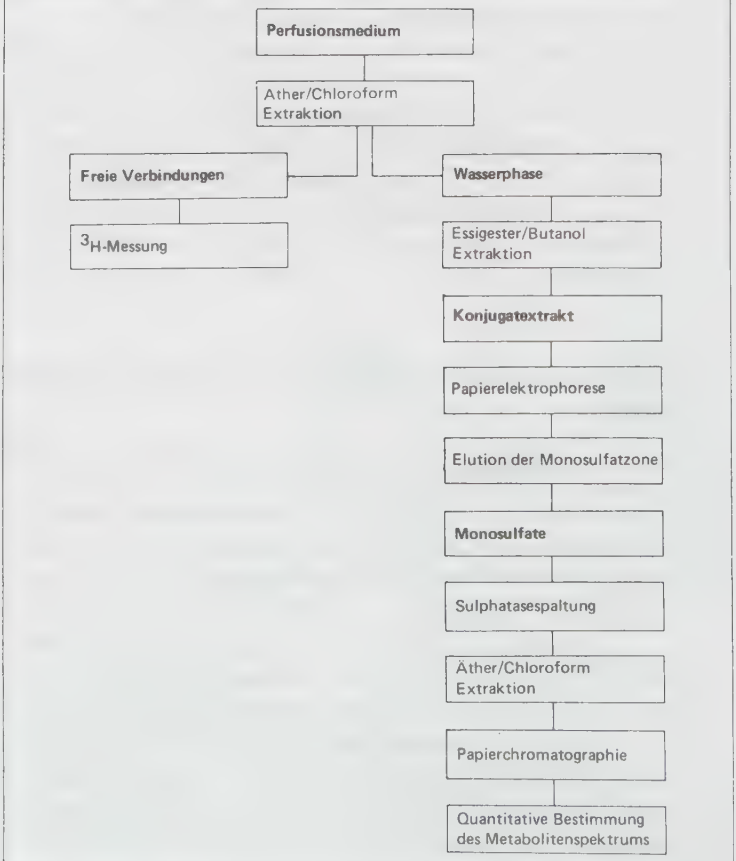
2.14

Aufarbeitung des Perfusionsmediums mit 6.7-^{3}H-Cortisol-21-sulfat

Zunächst wurden die evtl. bei der Perfusion durch Esterspaltung entstandenen freien radioaktiven Steroide extrahiert (s. 2.13). Die Extraktrückstände wurden in 5 ml Methanol aufgenommen und jeweils 0.1 ml dieser Lösung für die quantitative Bestimmung der Radioaktivität (s. 2.8) verwendet.
In der Wasserphase wurde die Konjugatextraktion nach Tamm [13] durchgeführt. Die Wasserphasen wurden mit NaCl (Endkonzentration 3 M) versetzt und 3 mal mit gleichem Volumen Essigester/Butanol 3:1 extrahiert.
Die vereinigten Essigester/Butanol Extrakte wurden über Na_2SO_4 getrocknet und bei 60°C im Vakuum zur Trockne gebracht. Der Trockenrückstand wurde in wenig Methanol

gelöst und papierelektrophoretisch getrennt (s. 2.7). Nach quantitativer Bestimmung der radioaktiven Steroidkonjugate auf den Elektropherogrammen (s. 2.8) wurde die den Cortisol-21-sulfaten entsprechende Zone 3 mal mit je 10 ml Methanol eluiert. Die vereinigten Eluate wurden zur Trockne gebracht und die in Wasser aufgenommenen Trockenrückstände mit Sulphatase hydrolysiert (s. 2.10). Nach Sulphatasespaltung wurden die Proben zur quantitativen Bestimmung der entstandenen freien radioaktiven Verbindungen wie die Perfusionsmedien mit 7-^{3}H-Cortisol aufgearbeitet (s. 2.13).
Der Arbeitsgang ist schematisch in Abb. 4 dargestellt.

Abb. 4 Schematische Darstellung der Aufarbeitung des Perfusionsmediums mit 6.7-^{3}H-Cortisol-21-sulfat



Die Galle wurde entsprechend dem Schema in Abb. 4 bis zur papierelektrophoretischen Trennung des Konjugatextraktes aufgearbeitet.

2.15
Versuche mit Leberschnitten

Die Tiere wurden durch Schlag auf den Kopf betäubt und nach Halsschnitt entblutet. Die Leber wurde sofort entnommen und in eiskalten Krebs-Henseleit-Ringer-Phosphat-Puffer (pH=7.2) gebracht. Die Leberschnitte (Dicke: 100-200 µ) wurden von Hand mit der Rasierklinge angefertigt. Zur Inkubation wurde folgender Standardansatz benutzt:

0.05 ml äthanolische Steroidlösung mit 200 µg 7-^{3}H-Cortisol bzw. 6.7-^{3}H-Cortisol-21-sulfat, äquimolar 200 µg Cortisol

4.00 ml Krebs-Henseleit-Ringer-Phosphat-Puffer, pH =7.2, mit 200 mg Glukose/100 ml

Start: 100 mg Leberschnitte

Es wurde 90 min im Schüttelthermostaten bei 37°C unter Luft inkubiert.

2.15.1
Aufarbeitung der Inkubationsansätze mit Leberschnitten

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 ml Äther/Chloroform 3:1 unterbrochen.
Die Ansätze mit 7-^{3}H-Cortisol wurden wie die Perfusionsmedien mit 7-^{3}H-Cortisol aufgearbeitet (s. 2.13).
Bei den Ansätzen mit 6.7-^{3}H-Cortisol-21-sulfat wurden zunächst die evtl. während der Inkubation entstandenen freien radioaktiven Verbindungen extrahiert und quantitativ bestimmt (s. 2.14). Die Wasserphase mit den Leberschnitten wurde zentrifugiert und das sedimentierte Lebergewebe 2 mal mit je 4 ml Wasser gewaschen. In einem aliquoten Teil der Wasserphase wurde die Sulphatasespaltung durchgeführt. Anschließend wurden die Proben wie die Perfusionsmedien mit 7-^{3}H-Cortisol aufgearbeitet (s. 2.13).

2.16

Versuche mit Mikrosomenpräparationen

Die Mikrosomenpräparation wurde nach Schriefers et al. [9,11] durchgeführt. Für die Stoffwechseluntersuchungen mit Mikrosomen wurde folgender Standardansatz benutzt:

	2.00 ml Tris-Puffer	($4.85 \cdot 10^{-3}$M)
	+ $MgCl_2 \cdot 6H_2O$	($2.42 \cdot 10^{-3}$M)
	0.25 ml G-6-P-Na_2	($17.6 \cdot 10^{-3}$M)
	0.25 $NADP^+$	($0.485 \cdot 10^{-3}$M)
	0.12 ml G-6-P-DH	$\hat{=}$ 48 µg Enzym
	0.06 ml äthanolische Steroidlösung	
Start:	1.60 ml Mikrosomensuspension, entspr. 400 mg Leber in 0.25 M Sucrose	
Gesamtvolumen:	4.28 ml	

Es wurde 15 min im Schüttelthermostaten bei 37°C unter Luft inkubiert.

2.16.1

Aufarbeitung der Inkubationsansätze mit Mikrosomen

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4 ml Äther/Chloroform 3:1 unterbrochen.
Die Ansätze mit 7-^{3}H-Cortisol wurden wie die Perfusionsmedien mit 7-^{3}H-Cortisol aufgearbeitet (s. 2.13).
Bei den Ansätzen mit 6.7-^{3}H-Cortisol-21-sulfat wurde die nach Extraktion der freien Verbindungen (s. 2.15.1) verbliebene Wasserphase mit aqua dest. auf 15 ml gebracht. Dann wurde die Wasserphase wie bei den entsprechenden Ansätzen mit Leberschnitten aufgearbeitet (s. 2.15.1).

2.17

Versuche mit Cytoplasma

Für die Stoffwechseluntersuchungen mit Cytoplasma wurde der 100 000 x g -Überstand des Leberhomogenates in Sucrose (s. Mikrosomenpräparation), entsprechend 500 mg Leberfeuchtgewicht ($\hat{=}$ 14 mg Protein), mit 600 µg 7-^{3}H-Cortisol bzw. 6.7-^{3}H-Cortisol-21-sulfat, äquimolar 600 µg Cortisol, 30 min inkubiert.

2.17.1

Aufarbeitung der Inkubationsansätze mit Cytoplasma

Die Aufarbeitung der Ansätze mit 7-^{3}H-Cortisol und 6.7-^{3}H-Cortisol-21-sulfat erfolgte in der bei den entsprechenden Ansätzen mit Mikrosomen beschriebenen Weise (s. 2.16.1).

2. 18

Abkürzungen

Die in der vorliegenden Arbeit benutzten Abkürzungen sind im folgenden erklärt:

F	Cortisol
F-21-S	Cortisol-21-sulfat
DHF	Dihydrocortisol
DHF-21-S	Dihydrocortisol-21-sulfat
THF	Tetrahydrocortisol
THF-21-S	Tetrahydrocortisol-21-sulfat
THF-3,21-DS	Tetrahydrocortisol-3,21-disulfat
M-17-Gl	Metenolonglukuronosid
G-6-P-Na_2	Glukose-6-Phosphat, Dinatriumsalz
G-6-P-DH	Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase
$NADP^{+}$	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
INH	Isonicotinsäure-Hydrazid
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
TG	Trockengewicht der Leber
p	Druck in cm Wassersäule

3
Ergebnisse

3.1
Untersuchungen zum Stoffwechsel von Cortisol und Cortisol-21-sulfat an der isoliert perfundierten Leber weiblicher Ratten

3.1.1
Substratabhängigkeit des Cortisol-Stoffwechsels bei Perfusion der isolierten Leber weiblicher Ratten mit steigenden Cortisolkonzentrationen

In einleitenden Versuchen wurden die Ring-A-Reduktion sowie der Schwund der Ketolseitenkette in Abhängigkeit von der Cortisolkonzentration im Perfusionsmedium untersucht.
Die Versuchsbedingungen der Perfusionsversuche 1 und 2 sind in Tab.1 angegeben.

Versuch	Tier-gewicht g	Leber-gewicht g	TG g	Durchfluß ml/g/min	p cm H_2O	Substrat	Konzentration µg/100 ml
1	220	8.9	2.3	1.9	30	F	100, 500 1000, 5000
2	240	9.5	2.5	1.5	26	F	50, 3000, 5000, 10000

Tab.1
Versuchsbedingungen der Perfusionsversuche 1 und 2

Die Perfusionen wurden durch eine Vorperfusion mit 180 ml Medium der niedrigsten Cortisolkonzentration eingeleitet. Es folgten einzelne Durchläufe mit je 100 ml neuem Medium steigender Cortisolkonzentrationen. Es wurden jeweils 3 Durchläufe mit der gleichen Cortisolkonzentration durchgeführt. Nach der jeweils 2. und 3. Leberpassage wurden 10 ml Perfusionsmedium aus dem Auffangglas entnommen und analysiert. In Tab. 2 sind als Beispiel für den Ablauf der Perfusionen 1 und 2

die Perfusionsvolumina, die Durchflußzeiten, die Cortisolkonzentrationen und die zur Analyse entnommenen Proben für die einzelnen Durchläufe des Versuches 1 angegeben.

Durchlauf Nr.	Perfusions-medium ml	Durchlaufzeit min. sec	Cortisol µg/100 ml	zur Analyse entnommen ml
Vorperfusion	180	12.00	100	–
1	100	6.20	100	–
2	100	6.10	100	10
3	100	5.30	100	10
4	100	5.00	500	–
5	100	5.00	500	10
6	100	5.55	500	10
7	100	6.05	1000	–
8	100	6.00	1000	10
9	100	5.55	1000	10
10	100	6.05	5000	–
11	100	6.00	5000	10
12	100	5.50	5000	10

Tab.2
Perfusionsablauf von Versuch 1

Die Ergebnisse der Perfusion 1 sind in den Abb. 5a und 5b zusammengefaßt.

Abb.5a

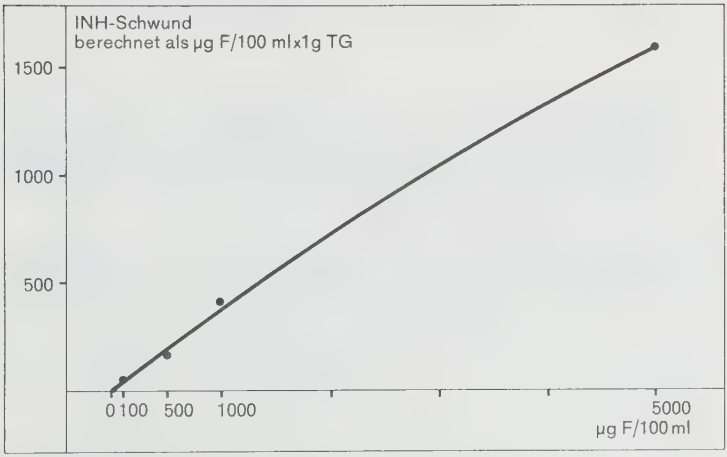


Abb. 5b

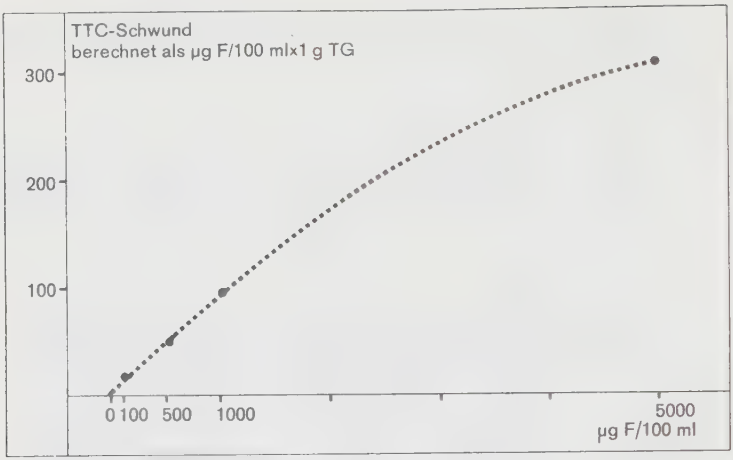


Abb. 5a und 5b
Ring-A-Reduktion (INH-Schwund, 5a) und Schwund der Ketolseitenkette (TTC-Schwund, 5b) bei Perfusion der isolierten Leber einer weiblichen Ratte mit steigenden Cortisolkonzentrationen.

Die Abb. 5a zeigt, daß die Ring-A-Reduktion (INH-Schwund) mit steigender Cortisolkonzentration im Perfusionsmedium praktisch linear zunimmt und daß auch mit 5000 µg Cortisol/100 ml die Substratsättigung der Enzyme noch nicht erreicht ist.
Die Abb. 5b zeigt, daß sich bei 5000 µg Cortisol/100 ml die Substratkonzentration der Sättigungskonzentration im Hinblick auf den Schwund der Ketolseitenkette nähert.

In einem weiteren Perfusionsversuch 2 wurde die Cortisolkonzentration bis auf 10 000 µg/100 ml Medium erhöht, um festzustellen, ob bei dieser extremen Corticoidkonzentration die für die Ring-A-Reduktion verantwortlichen Enzyme mit Substrat gesättigt sind.

Die Ergebnisse der Perfusion 2 sind in Abb. 6 wiedergegeben.

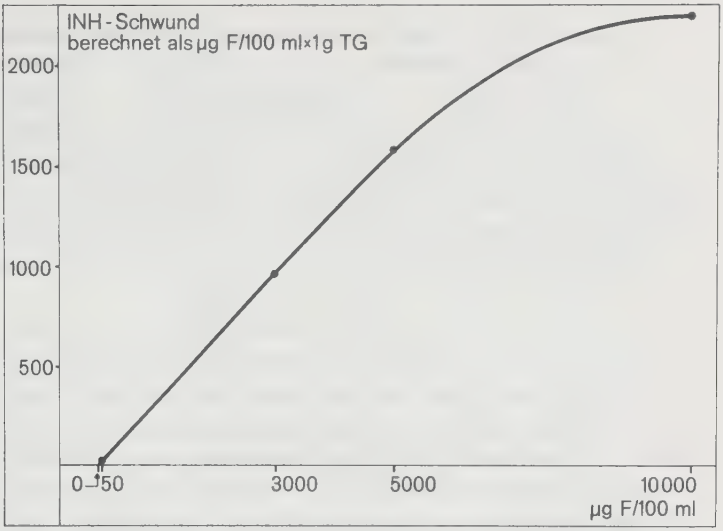


Abb.6
Ring-A-Reduktion (INH-Schwund) bei Perfusion der isolierten Leber einer weiblichen Ratte mit steigenden Cortisolkonzentrationen.

Nach Abb. 6 nimmt der INH-Schwund bis zu einer Substratkonzentration von ca. 5000 µg Cortisol/100 ml Medium angenähert linear zu. Der Kurvenverlauf in Abb. 6 spricht dafür, daß bei einer Substratkonzentration von 10 000 µg Cortisol/100 ml Perfusionsmedium die für die Ring-A-Reduktion verantwortlichen Enzyme mit Substrat gesättigt sind.

3.1.2
Zeitlicher Verlauf des Cortisol-Stoffwechsels an der isoliert perfundierten Leber unbehandelter weiblicher Ratten

Zur Bestimmung der bei der Ring-A-Reduktion des Cortisols entstehenden Metabolite wurde in den folgenden Versuchen mit 7-^{3}H-markiertem Cortisol gearbeitet.
Die Versuchsbedingungen der Perfusionsversuche 3 bis 5 sind in Tab. 3 angegeben.

Versuch	Tier-gewicht g	Leber-gewicht g	TG g	Durchfluß ml/g/min	p cm H_2O	Substrat	Konzen-tration µg/100 ml
3	210	6.8	1.6	1.6	19	7-^{3}H-F	2000
4	165	6.4	1.4	1.2	20	7-^{3}H-F	2000
5	165	6.0	1.3	1.0	19	7-^{3}H-F	2000

Tab.3
Versuchsbedingungen der Perfusionsversuche 3 bis 5

Die Perfusionen wurden durch eine Vorperfusion mit 300 ml Medium einer Cortisolkonzentration von 2000 µg nichtmarkiertem Cortisol/100 ml eingeleitet. Es folgte der 1. Durchlauf mit 300 ml neuem Medium einer Cortisolkonzentration von 2000 µg 7-^{3}H-markiertem Cortisol/100 ml. Anschließend wurde dasselbe Medium für weitere, von einander getrennt gehaltene Durchläufe verwendet. So stellten die Cortisolkonzentrationen der Proben, die am Ende eines jeden Durchlaufs aus dem Auffangglas abgenommen wurden, die jeweils neuen Ausgangskonzentrationen für den folgenden Durchlauf dar.
Als Beispiel für den Ablauf aller im folgenden beschriebenen Perfusionen sind in Tab.4 die Perfusionsvolumina, die Durchflußzeiten, die Ausgangscortisolkonzentrationen und die zur Analyse entnommenen Proben für die einzelnen Durchläufe des Versuchs 3 angegeben.

Durchlauf Nr.	Perfusions-medium ml	Durchlaufzeit min. sec	Cortisol µg/100 ml	zur Analyse entnommen ml
Vorperfusion	300	30.00	2000	–
1	300	26.00	7-^{3}H-mark. 2000	20
2	226	19.00		20
3	180	16.30		20
4	148	13.30		20
5	123	12.00		20

Tab.4
Perfusionsablauf des Versuchs 3

In den folgenden Abb. 7a- 7d sind einige Scanner-Diagramme dargestellt, aus denen das chromatographische Verhalten des Cortisols und der bei der Perfusion entstehenden Cortisol-Metabolite erkenntlich wird. In Abb.7a ist ein Scanner-Diagramm des Extraktes des 7-^{3}H-Cortisol-Ausgangsmediums, in Abb.7b- 7d die Metabolitenverteilung im Perfusionsmedium nach der 1., 2. und 3. Leberpassage dargestellt. Es ist das chromatographische Verhalten der

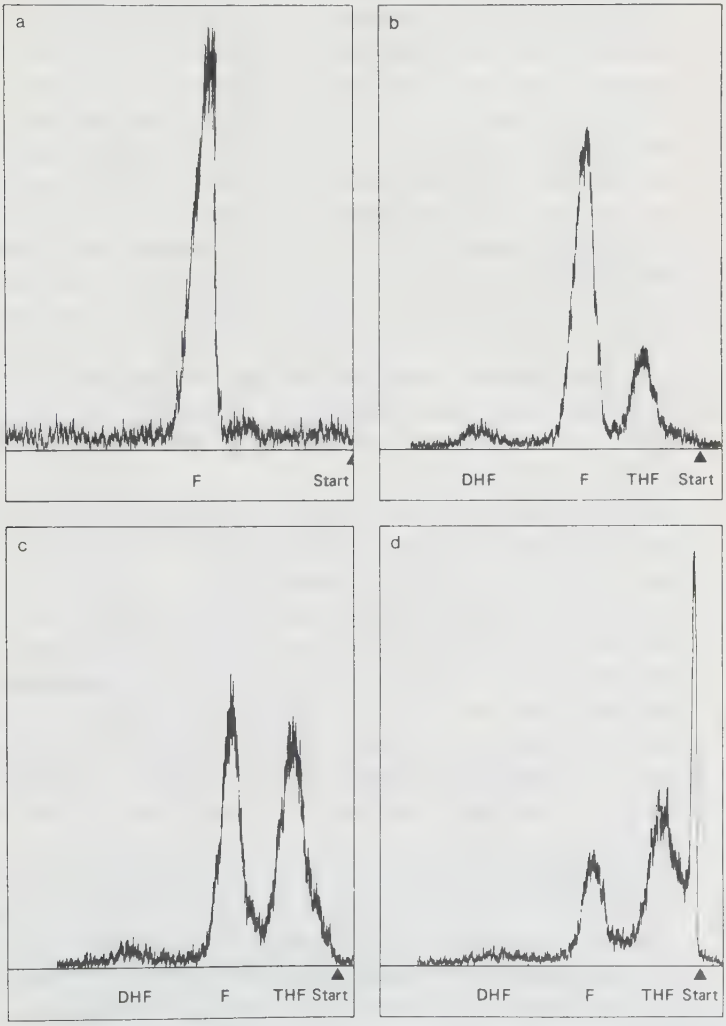


Abb. 7a - 7 d
Metabolitenverteilung im Ausgangsmedium (a) und nach der 1.- 3. Leberpassage (b-d) bei Perfusion der isolierten Leber einer weiblichen Ratte mit 2000 µg 7-^{3}H-Cortisol / 100 ml. Scanner-Diagramme der Extrakte nach Papierchromatographie.

jeweils parallel untersuchten authentischen Vergleichssubstanzen Cortisol (F), Dihydrocortisol (DHF) und Tetrahydrocortisol (THF) angegeben.
Nach der ersten Leberpassage (Abb. 7b) ist neben unverändertem Cortisol chromatographisch eine langsamer wandernde, stärker polare und eine schneller wandernde, weniger polare radioaktive Verbindung nachweisbar. Die beiden Metabolite verhielten sich chromatographisch wie authentisches Tetrahydrocortisol (stärker polare Verbindung) und wie authentisches Dihydrocortisol (weniger polare Verbindung). Wie die Abb. 7c und 7d zeigen, verschiebt sich die prozentuale Verteilung der radioaktiven Verbindungen bei wiederholter Leberpassage zunehmend zugunsten des polaren Tetrahydrocortisols. In dem in Abb. 7d wiedergegebenen Beispiel tritt zusätzlich ein Radioaktivitätspeak an der Auftragstelle des Chromatogramms (Start) auf. Da nach den in Abb. 5a und 5b gezeigten Ergebnissen neben der Ring-A-Reduktion auch die Ketolseitenkette metabolisiert wird (TTC-Schwund) liegt die Annahme nahe, daß es sich bei den am Start verbleibenden, sehr hoch polaren Verbindungen um Tetrahydrocortisol handelt, bei dem zusätzlich die 20-Ketogruppe reduziert wurde.

In Abb. 8 ist die prozentuale Verteilung der ^{3}H-Aktivität auf Cortisol und seine Metabolite im Perfusionsmedium für den Versuch 3 dargestellt.
Nach der 5. Leberpassage wurde nach Extraktion der freien radioaktiven Verbindungen die Radioaktivität in der Wasserphase gemessen. Nur 0.04 % der eingegebenen Radioaktivität war in der Wasserphase nachweisbar. Dies bedeutet, daß die nach den Leberpassagen im Perfusionsmedium nachweisbare Radioaktivität praktisch ausschließlich auf frei extrahierbare, d.h. nicht konjugierte Verbindungen entfällt.
Zur Prüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurde die vorstehend beschriebene Perfusion 3 in den Versuchen 4 und 5 wiederholt. Die Ergebnisse sind in den Abb. 9 und 10 wiedergegeben, wobei wieder die am Start nachweisbare Radioaktivität in den Tetrahydrocortisolbereich einbezogen wurde.

Abb. 8

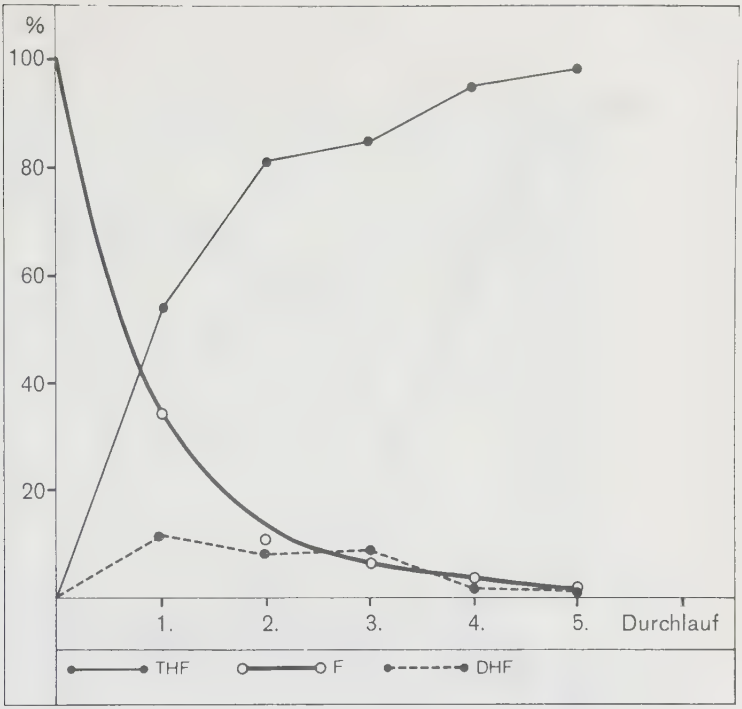

%
100
80
60
40
20
1.
2.
3.
4.
5.
Durchlauf
THF
F
DHF

Abb. 9

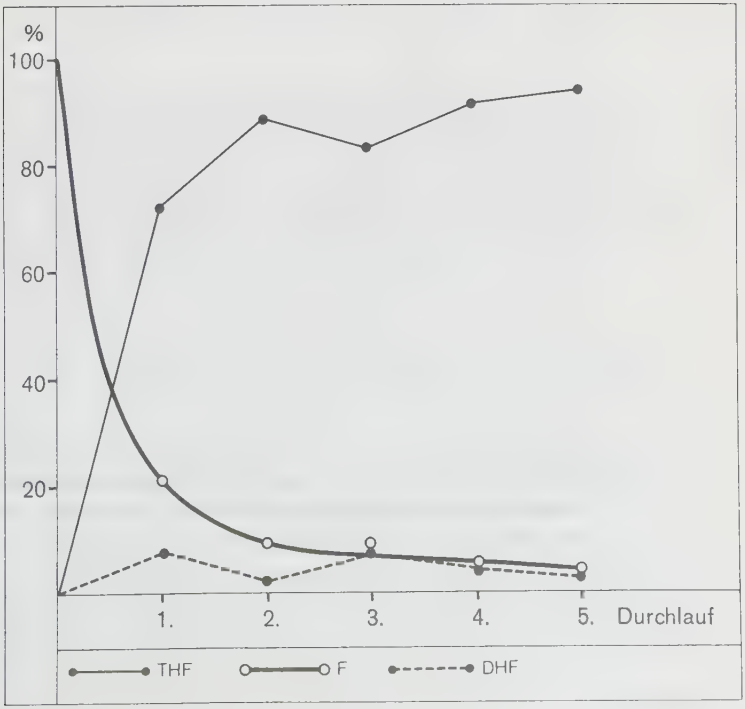

%
100
80
60
40
20
1.
2.
3.
4.
5.
Durchlauf
THF
F
DHF

Abb. 10

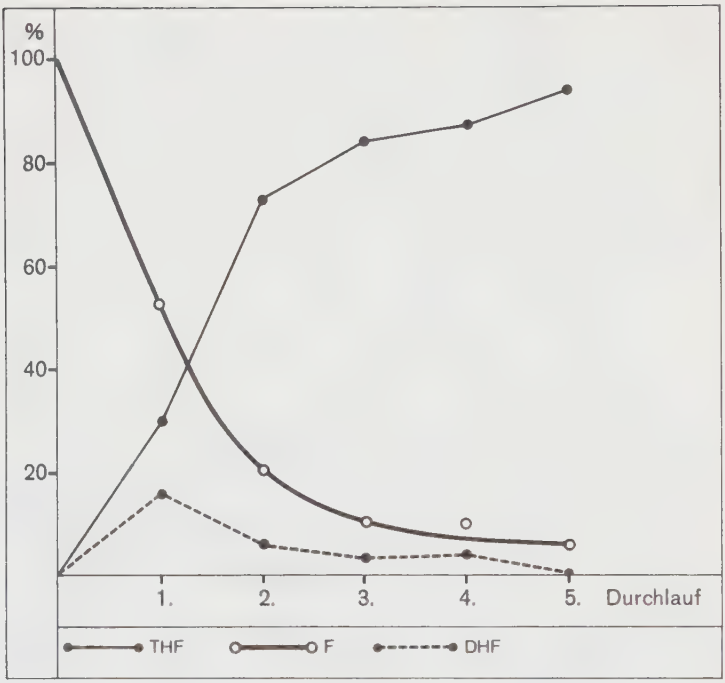


Abb. 8, 9 und 10
Prozentuale Verteilung der ^{3}H-Aktivität auf die Verbindungen Cortisol (F), Dihydrocortisol (DHF) und Tetrahydrocortisol (THF) im Perfusionsmedium vor und nach Perfusion der isolierten Leber unbehandelter weiblicher Ratten mit 2000 µg 7-^{3}H-Cortisol/100 ml Ausgangsmedium. Die nach wiederholten Leberpassagen am Start auftretende Radioaktivität wurde bei der Bestimmung der prozentualen Radioaktivitätsverteilung in den Tetrahydrocortisolbereich mit einbezogen.

In der Galle wurden bei Versuch 3 insgesamt 7.4 % der Radioaktivität gemessen, bei Versuch 4 insgesamt 5 % und bei Versuch 5 insgesamt 0.8 %.

In der Abb. 11 sind die Versuchsergebnisse zum Cortisol-Stoffwechsel an der isoliert perfundierten Leber unbehandelter weiblicher Ratten als Mittelwertskurve zusammengefaßt.

Abb. 11

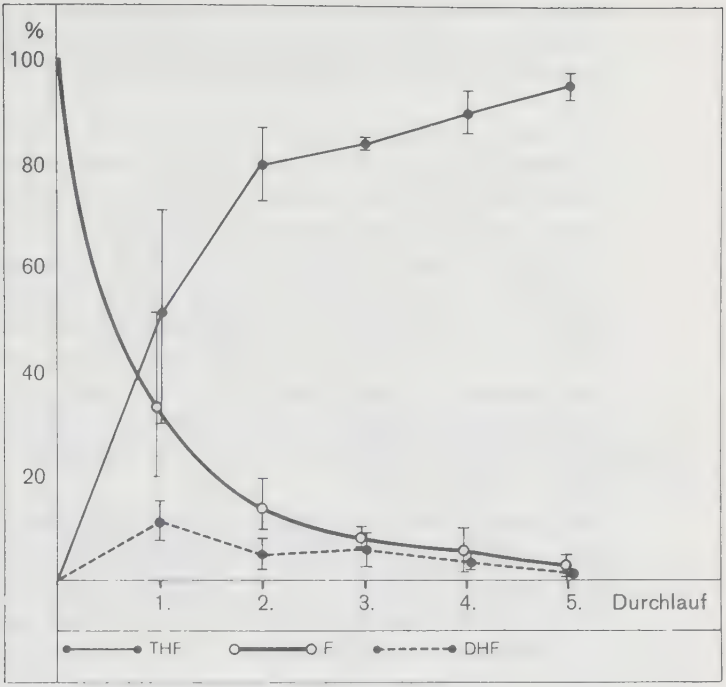


Abb. 11
Mittlere prozentuale Verteilung der ^{3}H-Aktivität auf die Verbindungen Cortisol (F), Dihydrocortisol (DHF) und Tetrahydrocortisol (THF) im Perfusionsmedium vor und nach Perfusion der isolierten Leber unbehandelter weiblicher Ratten mit 2000 µg 7-^{3}H-Cortisol/100 ml Ausgangsmedium. Die Mittelwerte wurden aus den in den Abb. 8 bis 10 wiedergegebenen Einzelwerten berechnet. Neben den Mittelwerten ist jeweils die Streubreite der Absolutwerte angegeben.

Aus Abb. 11 folgt, daß bei Perfusion der isolierten Leber unbehandelter weiblicher Ratten mit 2000 µg 7-^{3}H-Cortisol/100 ml Perfusionsmedium bereits nach der ersten Leberpassage die Konzentration des unveränderten Cortisols im Mittel auf etwa 35 % des Ausgangswertes abfällt. Der Anteil des Tetrahydrocortisols und noch stärker polarer Verbindungen nimmt bei wiederholten Leberpassagen zu, so daß nach der 4. Leberpassage etwa 90 % der radioaktiven Verbindungen im Perfusionsmedium auf diese Fraktion entfallen.

3.1.3

Hemmung des Cortisol-Stoffwechsels an der isoliert perfundierten Leber weiblicher Ratten durch Vorbehandlung der Tiere mit 17α-Methyl-testosteron

In orientierenden Versuchen wurde geprüft, ob die Vorbehandlung weiblicher Ratten mit 17α-Methyl-testosteron zu einer Hemmung des Cortisol-Stoffwechsels an der isoliert perfundierten Leber führt. Aus den in vivo Befunden beim Tier [1,4] und beim Menschen [15-17] sowie aus in vitro Untersuchungen mit Lebergewebe der Ratte [8] ist bekannt, daß die Verabreichung von 17α-Methyl-testosteron zu einer Hemmung des Cortisol-Stoffwechsels in der Leber führt. Es wurde untersucht, ob sich der Einfluß des 17α-Methyl-testosteron auf den Cortisol-Stoffwechsel auch an der isoliert perfundierten Leber nachweisen läßt.
Die Tiere wurden 3 Tage vor dem Perfusionsversuch täglich mit 5 mg 17α-Methyl-testosteron/100 g KG s.c. behandelt. Das Steroid war in Benzylbenzoat/Rizinusöl (4:6) gelöst. Die Perfusion wurde am 4. Tag nach Beginn der Behandlung durchgeführt.

Die Versuchsbedingungen der Perfusionsversuche 6 und 7 sind in Tab. 5 angegeben.

Versuch	Tier-gewicht g	Leber-gewicht g	TG g	Durchfluß ml/g/min	p cm H_2O	Substrat	Konzentration µg/100 ml
6	140	4.9	1.5	1.2	20	7-^{3}H-F	2000
7	145	4.95	1.9	1.65	20	7-^{3}H-F	2000

Tab. 5
Versuchsbedingungen der Perfusionsversuche 6 und 7

Die Ergebnisse der Versuche 6 und 7 sind in den Abb. 12 und 13 dargestellt.

Abb. 12

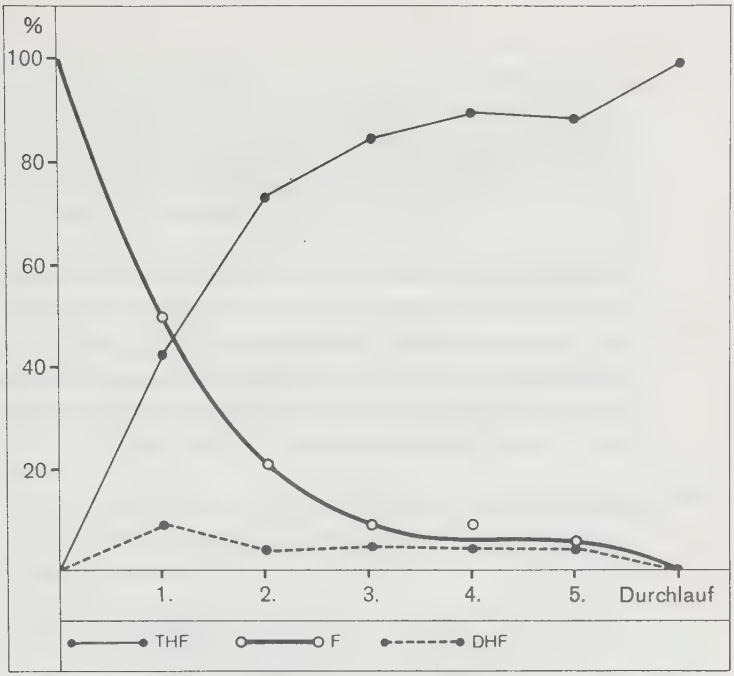

%
100
80
60
40
20
1.
2.
3.
4.
5.
Durchlauf
THF
F
DHF

Abb. 13

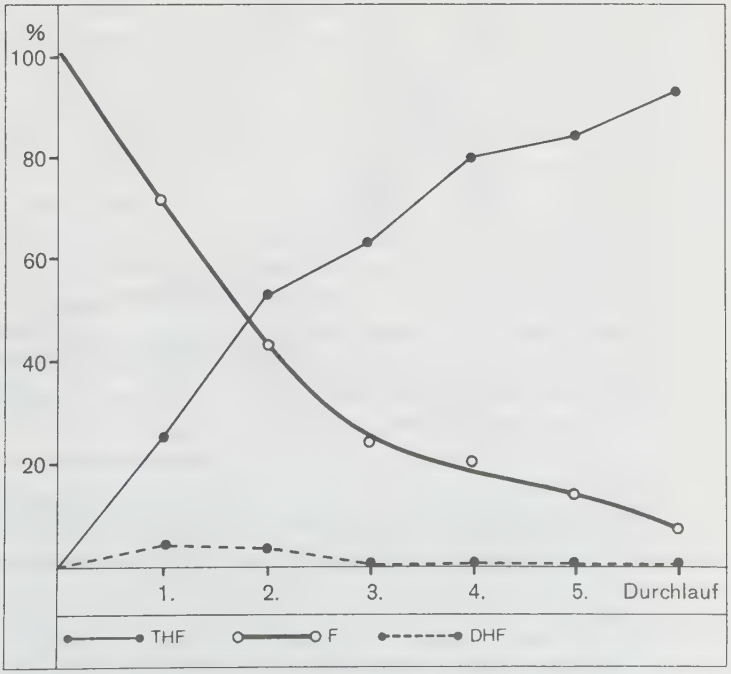

%
100
80
60
40
20
1.
2.
3.
4.
5.
Durchlauf
THF
F
DHF

Abb. 12 und 13
Prozentuale Verteilung der ^{3}H-Aktivität auf die Verbindungen Cortisol (F), Dihydrocortisol (DHF) und Tetrahydrocortisol (THF) im Perfusionsmedium vor und nach Perfusion der isolierten Leber weiblicher, mit 17α-Methyl-testosteron behandelter Ratten mit 2000 µg 7-3H-Cortisol/100 ml Ausgangsmedium.

In der Galle wurden bei Versuch 6 insgesamt 4.0 % der Radioaktivität gemessen, bei Versuch 7 insgesamt 3.5 %.

In der Abb. 14 sind die Versuchsergebnisse zum Cortisol-Stoffwechsel an der isoliert perfundierten Leber weiblicher, mit 17α-Methyl-testosteron behandelter Ratten als Mittelwertskurve zusammengefaßt.

Abb. 14

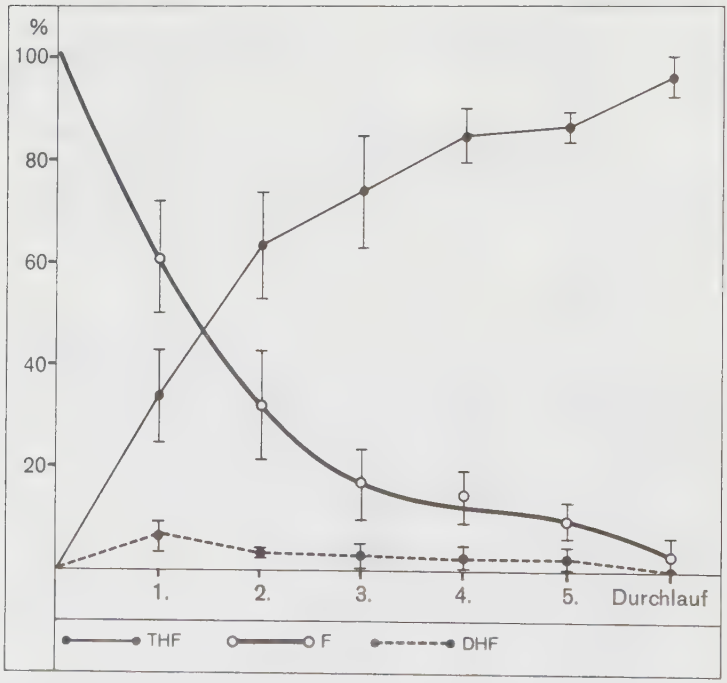


Abb. 14
Mittlere prozentuale Verteilung der ^{3}H-Aktivität auf die Verbindungen Cortisol (F), Dihydrocortisol (DHF) und Tetrahydrocortisol (THF) im Perfusionsmedium vor und nach Perfusion der isolierten Leber weiblicher, mit 17α-Methyl-testosteron behandelter Ratten mit 2000 µg 7-3H-Cortisol/100 ml Ausgangsmedium. Die Mittelwerte wurden aus den in den Abb. 12 und 13 wiedergegebenen Einzelwerten berechnet. Neben den Mittelwerten ist jeweils die Streubreite der Absolutwerte angegeben.

Beim Vergleich der Ergebnisse zum Cortisol-Stoffwechsel an der isoliert perfundierten Leber von 17α-Methyl-testosteron behandelten Tieren (Abb. 14) mit den an der isoliert perfundierten Leber unbehandelter Tiere erhaltenen Ergebnissen (Abb. 11) wird deutlich, daß die Behandlung mit 17α-Methyl-testosteron zu einer Hemmung des Cortisol-Stoffwechsels führt. Da die Untersuchungen zum 17α-Methyl-testosteron Einfluß auf den Cortisol-Stoffwechsel hier orientierenden Charakter haben sollten, wurde auf eine mehrmalige Wiederholung dieser Versuche und statistische Auswertung der Ergebnisse verzichtet.

3.1.4

Zeitlicher Verlauf des Cortisol-21-sulfat-Stoffwechsels an der isoliert perfundierten Leber unbehandelter weiblicher Ratten

Nach Untersuchungen von Gerhards et al. [2] werden Corticoid-21-Schwefelsäureester durch Homogenate verschiedener Gewebe der Ratte in vitro nicht hydrolysiert. Da sich andererseits z.B. Dexamethason-21-sulfat bei oraler Verabreichung sowohl bei der Ratte als auch beim Menschen bezüglich der Corticoidwirkungen praktisch wie freies Dexamethason verhält, stellte sich die Frage, ob die Corticoid-21-sulfate durch intakte Gewebe gespalten werden im Gegensatz zu Gewebehomogenaten.
Es wurde daher mit Ring-markiertem Cortisol-21-sulfat geprüft, ob an der isoliert perfundierten Rattenleber eine Hydrolyse des Schwefelsäureesters auftritt. Außerdem wurde am Modell der isoliert perfundierten Leber untersucht, ob Cortisol-21-sulfat per se, d.h. ohne vorherige Spaltung metabolisiert wird, und ob quantitative Unterschiede im Metabolitenspektrum zwischen dem Stoffwechsel des freien Cortisols und Cortisol-21-sulfates vorhanden sind.
Unter exakter Beibehaltung des vorstehend beschriebenen Perfusionsablaufes wurde 7-^{3}H-Cortisol im Perfusionsmedium durch 6.7-^{3}H-Cortisol-21-sulfat ersetzt.

Die Versuchsbedingungen der Perfusionsversuche 8 und 9 sind in Tab. 6 angegeben.

Versuch	Tier-gewicht g	Leber-gewicht g	TG g	Durchfluß ml/g/min	p cm H_2O	Substrat	Konzentration µg/100 ml
8	200	8.1	3.1	1.1	22	6.7-^{3}H-F-21-S	äquimol. 2000 F
9	180	6.5	1.6	1.0	20	6.7-^{3}H-F-21-S	äquimol. 2000 F

Tab. 6
Versuchsbedingungen der Perfusionsversuche 8 und 9

In Abb. 15 ist zur Verdeutlichung des elektrophoretischen Verhaltens der Steroid-Konjugate die Scanner-Auswertung eines Elektropherogramms wiedergegeben. In diesem Beispiel wurden Metenolonglukuronosid, Cortisol-21-sulfat und Tetrahydrocortisol-3,21-disulfat elektrophoretisch getrennt.

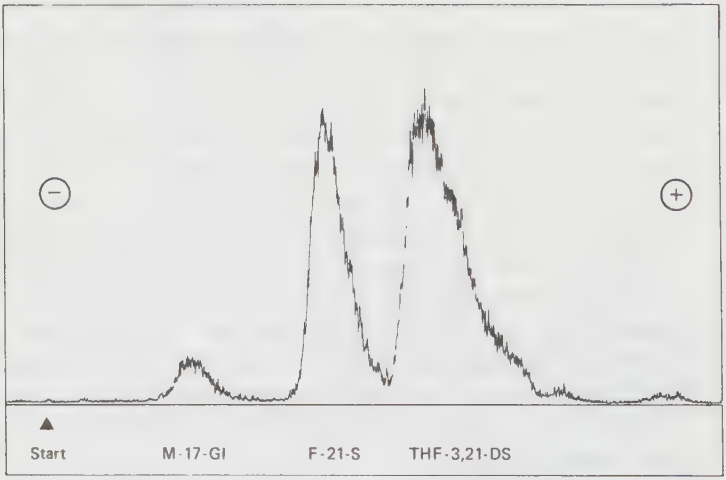


Abb. 15
Scanner-Diagramm eines Konjugatextraktes nach elektrophoretischer Trennung von Metenolonglukuronosid (M-17-Gl), Cortisol-21-sulfat (F-21-S) und Tetrahydrocortisol-3,21-disulfat (THF-3,21-DS).

Bei den Perfusionsversuchen 8 und 9 nahm der Anteil der mit Äther/Chloroform extrahierbaren freien Verbindungen mit der Anzahl der Durchläufe geringfügig zu. Im Ausgangsmedium waren keine frei extrahierbaren Verbindungen nachweisbar. Nach dem 7. Durchlauf betrug der Anteil der frei extrahierbaren Verbindungen in den beiden Versuchen 1.5 % bzw. 0.7 % der Gesamt-^{3}H-Aktivität im Perfusionsmedium. Wegen der geringen Aktivitätsmenge wurden keine Versuche zur Charakterisierung und Identifikation der frei extrahierbaren Verbindungen durchgeführt.
In der Galle wurden insgesamt 14 % bzw. 10 % der Radioaktivität gemessen. Aus der Galle waren mit Äther/Chloroform keine radioaktiven Verbindungen extrahierbar. Dies bedeutet, daß über die Galle keine freien, sondern nur konjugierte Steroide eliminiert wurden.
Die elektrophoretische Auftrennung der nach Essigester/Butanol Extraktion erhaltenen Konjugatfraktion der Galle ergab folgende Verteilung der ^{3}H-Aktivität auf die verschiedenen Konjugatfraktionen (s. Tab. 7 für Perfusionsversuch 8)

Konjugatfraktion	Prozentuale Verteilung der ^{3}H-Aktivität
an der Auftragstelle	8
Glukuronoside	10
Monosulfate	60
Disulfate	22

Tab. 7
Prozentuale Verteilung der radioaktiven Steroidkonjugate in der Galle. Die Verteilung wurde nach papierelektrophoretischer Auftrennung des Konjugatextraktes bestimmt.

Die folgenden Abb. 16a -16 g zeigen die Metabolitenverteilung im Ausgangsmedium und nach verschiedenen Durchläufen bei Perfusion der isolierten Rattenleber mit 6.7-^{3}H-Cortisol-21-sulfat. Es ist die papierchromatographische Verteilung der nach Sulphatasespaltung der Corticoid-Monosulfatfraktion erhaltenen freien Corticoide wiedergegeben.

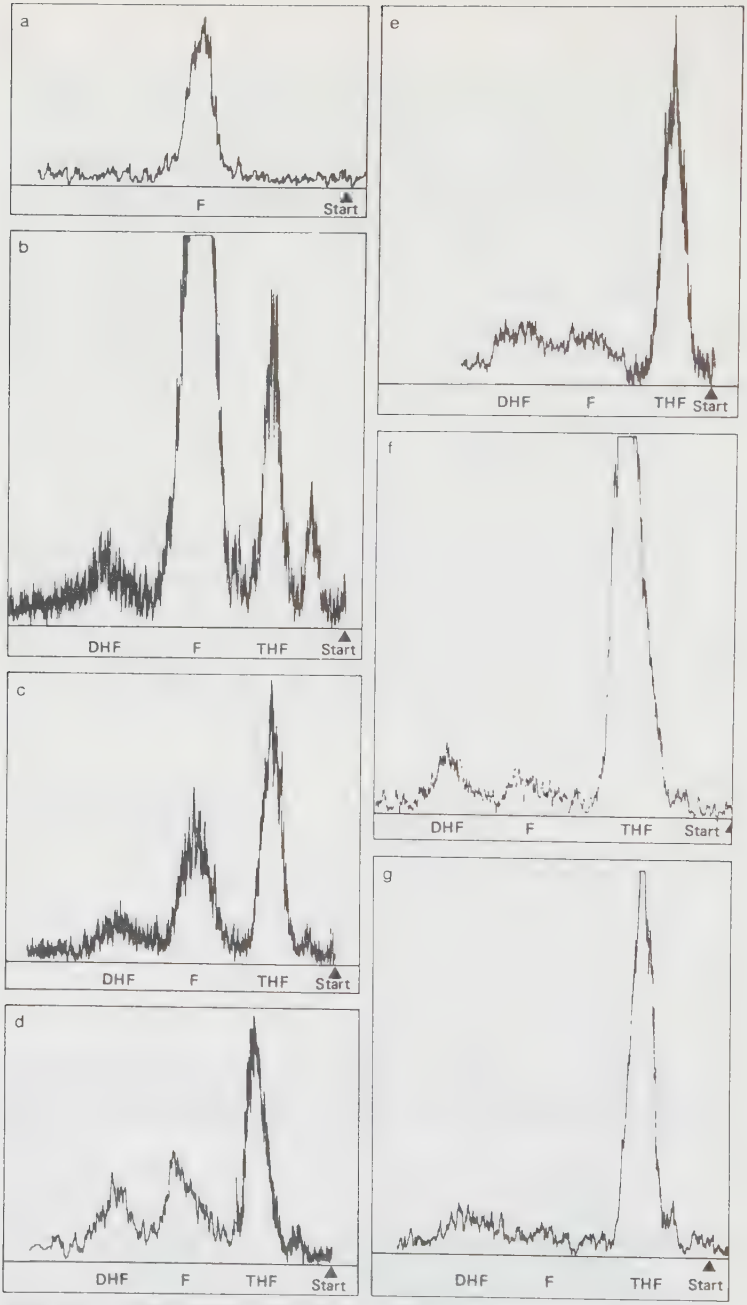


Abb. 16a - 16 g
Metabolitenspektrum im Ausgangsmedium (a) und nach den einzelnen Durchläufen (b-g) bei Perfusion der isolierten Leber einer weiblichen Ratte mit 6.7-^{3}H-Cortisol-21-sulfat, äquivalent 2000 µg Cortisol / 100 ml. Scanner-Diagramme nach papierchromatographischer Auftrennung des nach Sulfatasespaltung erhaltenen Steroidanteils der Monosulfatfraktion.

In den Abb. 17 und 18 ist die prozentuale Verteilung der ^{3}H-Aktivität auf die Monosulfate von Cortisol und seinen Metaboliten für die Versuche 8 und 9 wiedergegeben.

Abb. 17

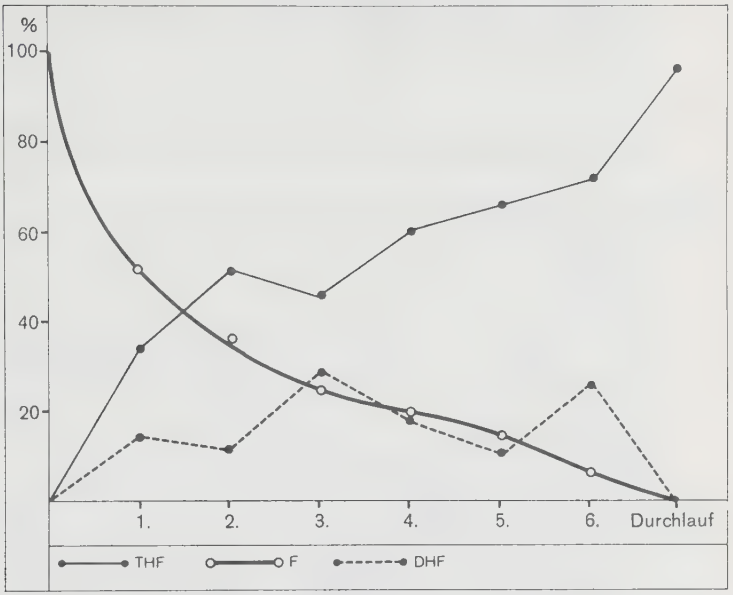


Abb. 18

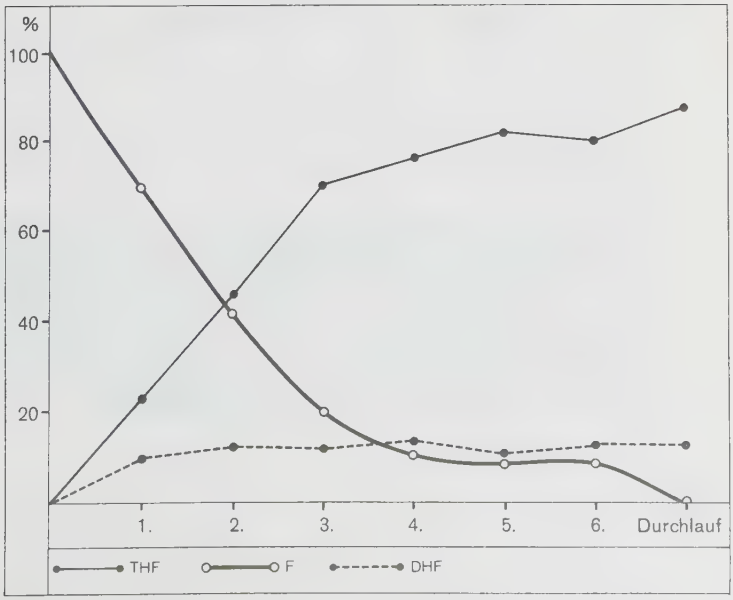


Abb. 17 und 18
Prozentuale Verteilung der ^{3}H-Aktivität auf die Monosulfate von Cortisol (F), Dihydrocortisol (DHF) und Tetrahydrocortisol (THF) im Perfusionsmedium vor und nach Perfusion der isolierten Leber unbehandelter weiblicher Ratten mit 6.7-^{3}H-Cortisol-21-sulfat, äquimolar 2000 µg Cortisol/100 ml. Das Metabolitenspektrum in der Monosulfatfraktion wurde nach Sulphatasespaltung und papierchromatographischer Auftrennung der freien Verbindungen bestimmt.

In Abb. 19 sind die in den Abb. 17 und 18 wiedergegebenen Einzelwerte als Mittelwertskurve zusammengefaßt.

Abb. 19

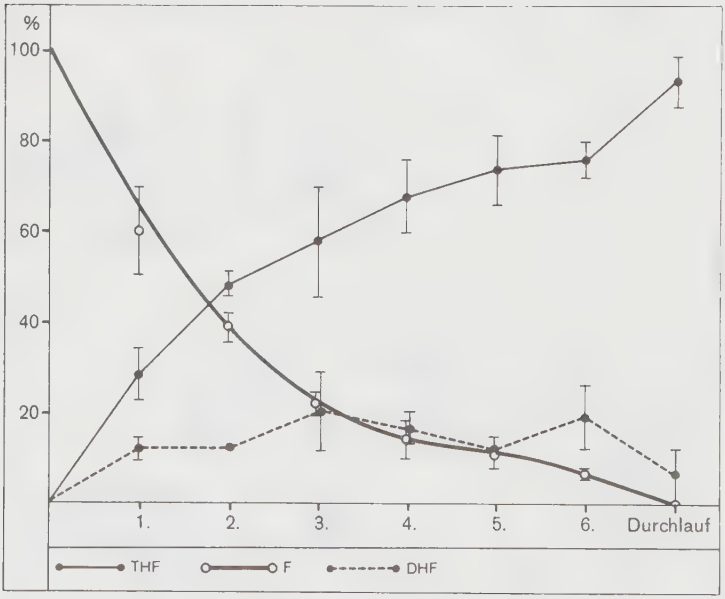


Abb. 19
Mittlere prozentuale Verteilung der ^{3}H-Aktivität auf die Monosulfate von Cortisol (F), Dihydrocortisol (DHF) und Tetrahydrocortisol (THF) im Perfusionsmedium vor und nach Perfusion der isolierten Leber unbehandelter weiblicher Ratten mit 6.7-^{3}H-Cortisol-21-sulfat, äquimolar 2000 µg Cortisol/100 ml. Die Mittelwerte wurden aus den in den Abb. 17 und 18 wiedergegebenen Einzelwerten berechnet. Neben den Mittelwerten ist jeweils die Streubreite der Absolutwerte angegeben.

Aus den vorstehend beschriebenen Untersuchungen mit Cortisol-21-sulfat folgt in Übereinstimmung mit den Befunden mit Leberhomogenat, daß Cortisol-21-sulfat auch durch die isoliert perfundierte Leber der weiblichen Ratte nur in äußerst geringem Umfang gespalten wird. Andererseits zeigten die Untersuchungen, daß der Steroidanteil im Cortisol-21-sulfat rasch metabolisiert wird, wobei wie beim freien Cortisol als Stoffwechselschritte die Hydrierung der Δ^4-Doppelbindung und der 3-Ketogruppe ganz im Vordergrund stehen.

Bei der chromatographischen Differenzierung der nach Sulphatasespaltung der Corticoid-Monosulfatfraktion erhaltenen freien Verbindungen fiel aber auf, daß der Anteil der im Vergleich zu Tetrahydrocortisol noch stärker polaren Verbindungen deutlich niedriger war als bei den Untersuchungen zum Stoffwechsel des freien Cortisols.

Die Befunde sprechen dafür, daß im Cortisol-21-sulfat die Reduktion der 20-Ketogruppe unter Bildung extrem polarer, in dem hier benutzten Papierchromatographiesystem nicht wandernder Verbindungen gehemmt ist. Andererseits fiel auf, daß der Dihydrocortisol-Anteil auch noch nach dem 7. Durchlauf deutlich größer war als bei den Perfusionsversuchen mit freiem Cortisol. Die Befunde sprechen dafür, daß der Übergang von Dihydrocortisol-21-sulfat zum Tetrahydrocortisol-21-sulfat etwas langsamer verläuft als der Übergang vom freien Dihydrocortisol zum freien Tetrahydrocortisol. Beim Vergleich der Abb. 11 und 19 wird deutlich, daß in der isoliert perfundierten Leber Cortisol-21-sulfat gegenüber freiem Cortisol offensichtlich etwas langsamer metabolisiert wird.

3.2
Untersuchungen zum Stoffwechsel von Cortisol und Cortisol-21-sulfat durch Gewebeschnitte und Mikrosomen der Leber weiblicher Ratten sowie durch Cytoplasma der Leber männlicher Ratten

Nach den bisher beschriebenen Untersuchungen an der isoliert perfundierten Leber weiblicher Ratten wird Cortisol-21-sulfat per se in der Leber metabolisiert unter Bildung vor allem von Dihydrocortisol-21-sulfat und Tetrahydrocortisol-21-sulfat. Der Abbau des Cortisol-21-sulfates war allerdings gegenüber dem Abbau des freien Cortisols verlangsamt.
Es stellte sich die Frage, ob die Ring-A-Reduktion im Cortisol-21-sulfat an den Enzymen selbst langsamer verläuft, oder ob bei intaktem Gewebe die Penetration des Cortisol-21-Schwefelsäureesters in die Zelle gegenüber freiem Cortisol langsamer verläuft.
Um einen Anhalt für die eventuell geschwindigkeitsbestimmende Penetration des Cortisol-21-sulfates durch die Zellmembran zu erhalten, wurde der Stoffwechsel von freiem Cortisol und Cortisol-21-sulfat an Leberschnitten weiblicher Ratten vergleichend geprüft.
Um den Einfluß der Zellmembran auf die Geschwindigkeit des Abbaus auszuschalten, wurde dann der Stoffwechsel von freiem Cortisol und Cortisol-21-sulfat an Mikrosomenpräparationen der Leber weiblicher Ratten vergleichend untersucht.
Außerdem wurde der Stoffwechsel von freiem Cortisol und Cortisol-21-sulfat durch Lebercytoplasma der männlichen Ratte vergleichend geprüft.

3.2.1
Vergleichende Untersuchungen zum Stoffwechsel von Cortisol und Cortisol-21-sulfat durch Gewebeschnitte der Leber weiblicher Ratten

Die prozentuale Verteilung der Radioaktivität auf Cortisol und seine Metabolite bzw. die entsprechenden Monosulfate nach Inkubation von 7-^{3}H-Cortisol und 6.7-^{3}H-Cortisol-21-sulfat mit Leberschnitten weiblicher Ratten ist für 2 Versuche in Tab. 8 wiedergegeben.

Versuch	Prozentuale Verteilung der ^{3}H-Aktivität					
	Cortisol			Cortisol-21-sulfat		
	F	DHF	THF	F-21-S	DHF-21-S	THF-21-S
1	26	20	54	68	7	25
	30	25	45	65	7	28
2	26	19	55	68	6	26
	31	25	44	66	6	28

Tab. 8
Prozentuale Verteilung der ^{3}H-Akitivität auf Cortisol (F), Dihydrocortisol (DHF) und Tetrahydrocortisol (THF) bzw. die entsprechenden 21-Sulfate nach Inkubation von 7-^{3}H-Cortisol und 6.7-^{3}H-Cortisol-21-sulfat mit Leberschnitten weiblicher Ratten. (Inkubationszeit: 90 min)

Zur Dokumentation des chromatographischen Verhaltens der nach Sulphatasespaltung extrahierten radioaktiven Verbindungen sind in Abb. 20a und 20b für die beiden Versuche die Scanner-Diagramme nach papierchromatographischer Auftrennung der Äther/Chloroform Extrakte wiedergegeben.

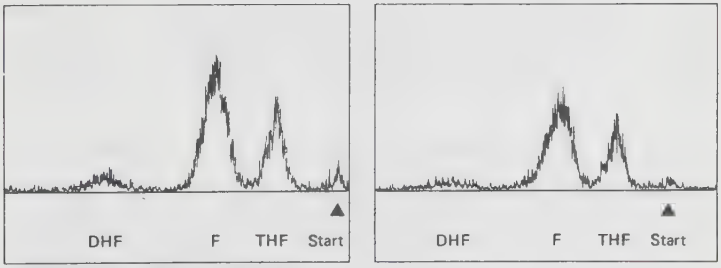


Abb. 20a und 20b
Radioaktivitätsverteilung auf die Monosulfate von Cortisol (F), Dihydrocortisol (DHF) und Tetrahydrocortisol (THF) nach Inkubation von 6.7-^{3}H-Cortisol-21-sulfat mit Leberschnitten weiblicher Ratten. Die chromatographische Trennung wurde nach Sulphatasespaltung und Extraktion der freien Verbindungen durchgeführt.

Wie Tab. 8 zeigt, wird Cortisol-21-sulfat durch Leberschnitte wesentlich langsamer metabolisiert als freies Cortisol. Diese Befunde stehen im Einklang mit den Untersuchungen an der isoliert perfundierten Leber und stützen damit die Annahme, daß der langsamere Abbau des Cortisol-21-sulfates an der perfundierten Leber durch die gegenüber freiem Cortisol herabgesetzte Penetrationsgeschwindigkeit in die Zelle bedingt ist.

3.2.2

Vergleichende Untersuchungen zum Stoffwechsel von Cortisol und Cortisol-21-sulfat durch Mikrosomenpräparationen der Leber weiblicher Ratten

Die prozentuale Verteilung der Radioaktivität auf Cortisol und seine Metabolite bzw. die entsprechenden Monosulfate nach Inkubation von 7-^{3}H-Cortisol und 6.7-^{3}H-Cortisol-21-sulfat mit Lebermikrosomen weiblicher Ratten ist für 2 Versuche im Tab. 9 wiedergegeben.

Versuch	Prozentuale Verteilung der ^{3}H-Aktivität					
	Cortisol			Cortisol-21-sulfat		
	F	DHF	THF	F-21-S	DHF-21-S	THF-21-S
1	11	57	32	6	82	12
	11	59	30	4	85	11
2	8	67	25	3	86	10
	8	67	25	3	88	9

Tab. 9
Prozentuale Verteilung der ^{3}H-Aktivität auf Cortisol (F), Dihydrocortisol (DHF) und Tetrahydrocortisol (THF) bzw. die entsprechenden 21-Sulfate nach Inkubation von 7-^{3}H-Cortisol und 6.7-^{3}H-Cortisol-21-sulfat mit Lebermikrosomen weiblicher Ratten.
(Inkubationszeit: 15 min)

Nach den in Tab. 9 wiedergegebenen Ergebnissen ist der Gesamt-Cortisol-Schwund gleich, unabhängig davon, ob freies Cortisol oder Cortisol-21-sulfat eingesetzt wurde. Die Reduktion zum Tetrahydrocortisol ist aber bei den Versuchen mit Cortisol-21-sulfat deutlich niedriger als bei den Versuchen mit freiem Cortisol. Umgekehrt ist der Dihydrocortisol-Anteil in den Versuchen mit Cortisol-21-sulfat deutlich höher als in den Versuchen mit freiem Cortisol.
Diese Befunde sprechen dafür, daß die Hydrierung der Δ^4-Doppelbindung im Cortisol und im Cortisol-21-sulfat mit gleicher Geschwindigkeit verläuft, daß aber die sich daran anschließende Reduktion der 3-Ketogruppe im Cortisol-21-sulfat langsamer verläuft, so daß es zu einem Anstau von Dihydrocortisol-21-sulfat kommt.
Beim Vergleich der Tab. 8 und 9 wird deutlich, daß Cortisol und in viel stärkerem Maße Cortisol-21-sulfat durch Leberschnitte weiblicher Ratten langsamer metabolisiert werden als durch Mikrosomen.
Diese Befunde stützen die Annahme, daß der im Vergleich mit Mikrosomen langsamere Abbau von Cortisol und Cortisol-21-sulfat durch Leberschnitte durch die Geschwindigkeit der Substratpenetration in die Zelle begrenzt wird, die für Cortisol-21-sulfat wesentlich niedriger sein dürfte als für Cortisol.

3.2.3
Vergleichende Untersuchungen zum Stoffwechsel von Cortisol und Cortisol-21-sulfat im Cytoplasma der Leber männlicher Ratten

Die prozentuale Verteilung der Radioaktivität auf Cortisol und seine Metabolite bzw. die entsprechenden Monosulfate nach Inkubation von 7-^{3}H-Cortisol und 6.7-^{3}H-Cortisol-21-sulfat mit Cytoplasma der Leber männlicher Ratten ist für 2 Versuche in Tab. 10 angegeben.

Versuch	Prozentuale Verteilung der ^{3}H-Aktivität					
	Cortisol			Cortisol-21-sulfat		
	F	DHF	THF	F-21-S	DHF-21-S	THF-21-S
1	89	0	11	89	0	11
	87	0	13	88	0	12
2	86	0	14	87	0	13
	88	0	12	88	0	13

Tab. 10
Prozentuale Verteilung der ^{3}H-Aktivität auf Cortisol (F), Dihydrocortisol (DHF) und Tetrahydrocortisol (THF) bzw. die entsprechenden 21-Sulfate nach Inkubation von 7-^{3}H-Cortisol und 6.7-^{3}H-Cortisol-21-sulfat mit Cytoplasma der Leber männlicher Ratten.
(Inkubationszeit: 30 min)

Die Tab. 10 zeigt, daß Cortisol-21-sulfat und Cortisol durch Cytoplasma der Leber männlicher Ratten mit gleicher Geschwindigkeit metabolisiert werden.
Die Reduktion des Dihydrocortisol-21-sulfates und des freien Dihydrocortisols zu den entsprechenden Tetrahydro-Verbindungen verläuft offensichtlich so rasch, daß das mit nur geringer Geschwindigkeit entstehende Dihydrocortisol bzw. Dihydrocortisol-21-sulfat so schnell in die entsprechenden Tetrahydro-Verbindungen überführt wird, daß die Dihydro-Verbindungen analytisch nicht erfaßbar sind.
Auch dieser Befund spricht wie die Untersuchungen mit Mikrosomenpräparationen dafür, daß die Δ^4-Reduktion sowohl nach 5α-H (durch Mikrosomen) als auch nach 5β-H (durch Cytoplasma) beim Cortisol und Cortisol-21-sulfat mit gleicher Geschwindigkeit verläuft, und daß der in der Leberperfusion und mit Leberschnitten beobachtete langsamere Gesamtabbau des Cortisol-21-sulfates durch die herabgesetzte Penetrationsgeschwindigkeit durch die Zellmembran bedingt ist.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollten folgende Fragen untersucht werden:

1. Werden Corticoid-21-sulfate durch die isoliert perfundierte Leber gespalten?
2. Werden Corticoid-21-sulfate im Steroidring per se, d.h. ohne vorhergehende Spaltung metabolisiert?
3. Ist der Stoffwechsel der freien Corticoide und der Corticoid-21-sulfate qualitativ und quantitativ vergleichbar?

Die vorstehenden Fragen wurden am Beispiel des Cortisols und Cortisol-21-sulfates bearbeitet.

In einleitenden Versuchen wurde zunächst geprüft, welche Substratkonzentration (Cortisol) im Perfusionsmedium für die geplanten Untersuchungen an der isoliert perfundierten Leber geeignet war. Nach Abb. 5a und 6 nimmt die Geschwindigkeit der Ring-A-Reduktion im Cortisol, gemessen am Schwund der Δ^4-3-Ketogruppe mit steigender Substratkonzentration im Perfusionsmedium bis zu einer Konzentration von ca. 5000 µg/100 ml etwa linear zu. Bei 5000 µg Cortisol/100 ml Perfusionsmedium werden pro 1 g Lebertrockengewicht bei einmaliger Leberpassage ca. 1500 µg Cortisol/100 ml im Ring A reduziert. Die Reduktion der 20-Ketogruppe im Cortisol, gemessen am TTC-Schwund, verläuft nach Abb. 5b etwa um den Faktor 5 langsamer als die Ring-A-Reduktion, so daß von 5000 µg Cortisol/100 ml Perfusionsmedium pro 1 g Lebertrockengewicht bei einmaliger Leberpassage 300 µg Cortisol/100 ml in der Ketolseitenkette reduziert werden.
Aufgrund dieser Ergebnisse wurde bei den folgenden vergleichenden Stoffwechseluntersuchungen mit Cortisol und Cortisol-21-sulfat mit einer Substratkonzentration von 2000 µg Cortisol bzw. einer äquimolaren Cortisol-21-sulfat-Konzentration gearbeitet.

Nach Perfusion der isolierten Leber mit freiem 7-^{3}H-markiertem Cortisol waren nach chromatographischer Differenzierung der radioaktiven Verbindungen im

Perfusionsmedium neben unverändertem Cortisol das Dihydrocortisol und Tetrahydrocortisol nachweisbar. Bei wiederholter Passage desselben Mediums nahm der Anteil des Cortisols vor allem zugunsten des Tetrahydrocortisols ab (Abb. 7a-7d, 8-10 und 11). Der Anteil sehr hoch polarer Metabolite, die in dem verwendeten Chromatographiesystem am Start liegenblieben nahm zu. Die hochpolaren radioaktiven Verbindungen am Start wurden in Ermangelung entsprechender Vergleichssubstanzen nicht näher untersucht und bei der quantitativen Auswertung der Metabolitenverteilung auf den Chromatogrammen zum Tetrahydrocortisol gerechnet, da es sich bei diesen Verbindungen mit hoher Wahrscheinlichkeit um Tetrahydrocortisol handeln dürfte, bei dem zusätzlich die 20-Ketogruppe reduziert wurde. Auch nach 5 maliger Leberpassage lagen die radioaktiven Verbindungen im Perfusionsmedium praktisch vollständig als frei extrahierbare Verbindungen vor, d.h. sie wurden nicht während der Perfusion in der Leber konjugiert. Aus den Abb. 8-10 und 11 folgt, daß der Anteil des Dihydrocortisols in den einzelnen Durchläufen angenähert konstant blieb im Gegensatz zum Tetrahydrocortisol, das während der ersten beiden Durchläufe sehr stark und dann langsamer anstieg.

Um die Brauchbarkeit des Systems der isoliert perfundierten Leber zur Erfassung geringfügiger Unterschiede im Cortisol-Stoffwechsel zu prüfen, wurden durch Vorbehandlung der Ratten mit 17α-Methyl-testosteron Bedingungen erzeugt, von denen bekannt ist, daß durch sie der Cortisolabbau in der Leber vermindert wird. 17α-Methyl-testosteron und andere 17α-alkylierte Testosteronderivate führen nach zahlreichen Untersuchungen am Tier, in vivo und in vitro sowie beim Menschen zu einer Hemmung der Ring-A-Reduktion des Cortisols [1,4,8, 15-17].
Nach den in den Abb. 12, 13 und 14 wiedergegebenen Ergebnissen ließ sich die Hemmung des Cortisolabbaus durch Vorbehandlung der Tiere mit 17α-Methyl-testosteron auch an der isoliert perfundierten Leber nachweisen. Aus dem Vergleich der Mittelwertskurven in Abb. 11 und 14 geht hervor, daß bei nicht vorbehandelten Tieren der

Cortisolschwund nach einmaliger Leberpassage etwa 60 % bzw. nach der 2. Passage etwa 80 % beträgt, während er bei den mit 17α-Methyl-testosteron vorbehandelten Tieren nach der 1. Leberpassage bei etwa 40 %, nach der 2. bei etwa 60 % liegt.
Im Hinblick auf den orientierenden Charakter der Untersuchungen wurden die Versuche mit 17α-Methyl-testosteron behandelten Tieren allerdings nicht oft genug wiederholt, um den Unterschied im Cortisol-Stoffwechsel bei behandelten und unbehandelten Tieren statistisch zu sichern. Trotz dieser Einschränkung sprechen die Versuchsergebnisse dafür, daß am Modell der isoliert perfundierten Leber auch an sich nur geringfügige Unterschiede in der Geschwindigkeit des Cortisolabbaus erfaßbar sind.

Bei den Untersuchungen des Cortisol-21-sulfat-Stoffwechsels war der analytische Aufwand deutlich größer als bei den Untersuchungen des Cortisol-Stoffwechsels. Zur Beantwortung der Frage nach einer möglichen enzymatischen Hydrolyse des Cortisol-21-sulfates bei der Perfusion wurde das Perfusionsmedium nach jeder Leberpassage zur Erfassung der eventuell freigesetzten radioaktiven Steroide mit Äther/Chloroform extrahiert. Danach wurde, wie im methodischen Teil ausführlich beschrieben, das in der Wasserphase vorhandene Corticoid-21-sulfat enzymatisch quantitativ gespalten und die freigesetzten Steroide nach Extraktion chromatographisch differenziert.
Bei den Perfusionsversuchen mit 6.7-^{3}H-Cortisol-21-sulfat waren auch nach mehrmaliger Leberpassage praktisch keine frei extrahierbaren radioaktiven Verbindungen im Perfusions. .dium nachweisbar. D.h., daß entsprechend den in vitro Untersuchungen an Homogenaten der Rattenleber [2] Corticoid-21-sulfate auch an der isoliert perfundierten Rattenleber nicht in nennenswertem Umfang gespalten werden.

Über die Galle wurden bei den Perfusionsversuchen mit freiem Cortisol im Mittel 4 % der insgesamt im Ausgangsmedium vorhandenen Radioaktivität eliminiert. Bei den Versuchen mit Cortisol-21-sulfat war der über die Galle

ausgeschiedene Anteil mit 12 % der Eingabe deutlich höher. Es ist bemerkenswert, daß in der Galle bei der Leberperfusion mit Cortisol-21-sulfat elektrophoretisch neben unverändertem Cortisol-21-sulfat mehrere andere Konjugate nachweisbar waren, wobei besonders der hohe Anteil eines Konjugates auffiel, das sich elektrophoretisch wie Tetrahydrocortisol-3,21-disulfat verhielt. Auf diese Verbindung entfielen ca. 20 % der über die Galle ausgeschiedenen Radioaktivität. Da die radioaktiven Verbindungen in der Galle im Hinblick auf die Fragestellung der vorliegenden Arbeit nur einen Nebenbefund darstellten, wurde auf die weitere Untersuchung und Identifikation der radioaktiven Verbindungen in der Galle verzichtet.

Es ist überraschend, daß nach den Abb. 16a-16g Cortisol in Form des Cortisol-21-sulfates bei der Leberperfusion qualitativ wie das freie Cortisol metabolisiert wird, d.h. aus Cortisol-21-sulfat entstehen bei der Leberperfusion Dihydrocortisol-21-sulfat und Tetrahydrocortisol-21-sulfat. Der Vergleich der Mittelwertskurven für die Geschwindigkeit des Abbaus von Cortisol bzw. Cortisol-21-sulfat in den Abb. 11 und 19 zeigt, daß Cortisol-21-sulfat offensichtlich durch die perfundierte Leber langsamer metabolisiert wird als freies Cortisol, so daß nach dem 1. bzw. 2. Durchlauf Cortisol zu 60 % bzw. 80 %, Cortisol-21-sulfat aber nur zu 40 % bzw. 60 % abgebaut werden. Es ist bemerkenswert, daß der prozentuale Anteil des freien Dihydrocortisols in den verschiedenen Durchläufen deutlich niedriger ist als der des Dihydrocortisol-21-sulfates. Andererseits nimmt aber der prozentuale Anteil des freien Tetrahydrocortisols mit der Anzahl der Durchläufe wesentlich rascher zu als der des Tetrahydrocortisol-21-sulfates.
Die vorstehend beschriebenen Befunde sprechen dafür, daß der Stoffwechsel des Steroidringes im Cortisol-21-sulfat insgesamt langsamer verläuft als der des freien Cortisols, und daß die Reduktion des Dihydrocortisol-21-sulfates zum Tetrahydrocortisol-21-sulfat offensichtlich etwas langsamer verläuft als die Reduktion des freien Dihydrocortisols zum freien Tetrahydrocortisol.

Es liegt nahe, für den im Vergleich zum freien Cortisol langsameren Abbau des Cortisol-21-sulfates zwei Gründe anzunehmen:

1. verzögerter Übergang aus dem extra- in den intrazellulären Raum beim Cortisol-21-sulfat
2. eine geringere Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktionen beim Cortisol-21-sulfat

Für die erste Annahme spricht, daß im allgemeinen die Permeationsgeschwindigkeit durch die Zellmembran mit steigender Lipoidlöslichkeit einer Verbindung zunimmt. Man müßte demnach erwarten, daß die Permeationsgeschwindigkeit durch die Zellmembran beim freien Cortisol höher ist als die beim Cortisol-21-sulfat. Für die 2. Annahme sprechen zahlreiche Experimentalbefunde [35], nach denen auch geringfügige strukturelle Veränderungen am Ring-D des Steroidmoleküls zu deutlichen Veränderungen der Stoffwechselschritte am Ring-A führen können.

Zur Prüfung dieser Annahmen wurden vergleichende Stoffwechseluntersuchungen mit Cortisol und Cortisol-21-sulfat an Schnitten und Zellfraktionen der Rattenleber durchgeführt.

Nach Tab. 8 wird Cortisol-21-sulfat wesentlich langsamer durch Leberschnitte weiblicher Ratten abgebaut als freies Cortisol. Andererseits werden die beiden Verbindungen durch Mikrosomenpräparationen der Leber weiblicher Ratten praktisch mit gleicher Geschwindigkeit metabolisiert (s. Tab. 9). Diese Ergebnisse stützen die oben unter 1 gemachte Annahme, da der im Vergleich zum freien Cortisol langsamere Abbau des Cortisol-21-sulfates nur bei Leberschnitten, d.h. bei Anwesenheit der Zellmembran, und nicht bei Mikrosomenpräparationen, d.h. bei Ausschaltung der Zellmembran, zu beobachten ist.

Die Untersuchungen zur Hydrierung der Δ^4-3-Ketogruppe im Cortisol bzw. Cortisol-21-sulfat durch Mikrosomen der weiblichen Ratte zeigen, daß die 5α-H-Reduktion der 4-Doppelbindung in beiden Verbindungen mit gleicher Geschwindigkeit verläuft. Diese Aussage ist erlaubt, da die 4-Doppelbindung im Steroidmolekül durch Mikrosomen weiblicher Ratten in Gegenwart des NADPH regenerierenden Systems ausschließlich nach 5α-H hydriert wird.

Da andererseits die Mikrosomen der weiblichen Rattenleber mit einer 3β-ol-Reduktase ausgestattet sind, d.h. einem Enzym, das die 3-Ketogruppe im Steroidmolekül nach 3β-ol reduziert, folgt aus Tab. 9, daß im Cortisol-21-sulfat die 3β-Reduktion der 3-Ketogruppe im Vergleich zum freien Cortisol gehemmt ist.
Zusätzlich zu den Untersuchungen mit partikelgebundenen Steroidstoffwechsel-Enzymen (5α-H-Reduktase und 3β-ol-Dehydrogenase) in Mikrosomen der Leber weiblicher Ratten wurde die Ring-A-Reduktion im Cortisol und Cortisol-21-sulfat mit gelösten Enzymen im Cytoplasma der Leber männlicher Ratten geprüft. Im Cytoplasma der Leber männlicher Ratten sind neben einer Δ^4-5β-H-Reduktase geringer Aktivität eine 3β-ol-Reduktase geringer und eine 3α-ol-Reduktase hoher Aktivität enthalten. Dementsprechend sind die in Tab. 10 wiedergegebenen Versuchsergebnisse in folgender Weise zu interpretieren: Die Δ^4-Doppelbindung im Cortisol und Cortisol-21-sulfat wird durch die cytoplasmatische Δ^4-5β-H-Reduktase der Leber männlicher Ratten mit gleicher Geschwindigkeit in geringem Maße reduziert. Das dabei entstehende Dihydrocortisol bzw. Dihydrocortisol-21-sulfat wird durch die cytoplasmatische 3α-ol-Dehydrogenase hoher Aktivität so rasch zu den entsprechenden Tetrahydro-Verbindungen weiter reduziert, daß die als Zwischenstufe auftretenden Dihydro-Verbindungen analytisch nicht faßbar werden.

Zusammenfassend zeigen die mit Schnitten und Zellfraktionen der Rattenleber erhaltenen Befunde, daß der an der isoliert perfundierten Leber gefundene langsamere Abbau des Cortisol-21-sulfates im Vergleich zum freien Cortisol mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit auf eine herabgesetzte Permeationsgeschwindigkeit des Steroid-Schwefelsäureesters in die Zelle zurückzuführen ist. Außerdem zeigen diese Befunde, daß durch die Veresterung des Cortisols mit Schwefelsäure an der Hydroxygruppe in C_{21} die Geschwindigkeit der mikrosomalen Δ^4-5α-Reduktion und der cytoplasmatischen Δ^4-5β-Reduktion sowie der 3α-ol-Reduktion nicht beeinflußt wird, daß aber offensichtlich die mikrosomale 3β-ol-Reduktion durch die Veresterung gehemmt wird.

5 Zusammenfassung

Es wurde der Stoffwechsel von 7-^{3}H-markiertem Cortisol und 6.7-^{3}H-markiertem Cortisol-21-sulfat an der isoliert perfundierten Rattenleber sowie an Schnitten und Zellfraktionen der Rattenleber vergleichend untersucht.

Die auch an der isoliert perfundierten Leber nachweisbare Hemmung des Cortisolabbaus durch Vorbehandlung der Versuchstiere mit 17α-Methyl-testosteron spricht für die Brauchbarkeit des Systems der isoliert perfundierten Leber zu Untersuchungen des Cortisolabbaus.

Cortisol-21-sulfat wird durch die isoliert perfundierte Rattenleber nicht unter Freisetzung von freiem Cortisol gespalten.

Cortisol-21-sulfat wird qualitativ wie freies Cortisol metabolisiert, d.h. bei der Perfusion und nach Inkubation von Schnitten und Zellfraktionen der Rattenleber entstehen Dihydrocortisol-21-sulfat sowie Dihydrocortisol und Tetrahydrocortisol-21-sulfat sowie Tetrahydrocortisol, wobei der Anteil der Dihydro-Verbindungen über die Zeit etwa gleich bleibt, während der Anteil der Tetrahydro-Verbindungen ansteigt.

Cortisol-21-sulfat wird an der isoliert perfundierten Leber und durch Leberschnitte, d.h. bei Anwesenheit der Zellmembran, langsamer metabolisiert als freies Cortisol. Andererseits werden die beiden Verbindungen durch Mikrosomenpräparationen und Cytoplasma der Leber, d.h. bei Ausschaltung der Zellmembran, mit etwa gleicher Geschwindigkeit abgebaut.

An der isoliert perfundierten Leber und durch Mikrosomenpräparationen erfolgt die Reduktion des Dihydrocortisol-21-sulfates zum Tetrahydrocortisol-21-sulfat langsamer als die Reduktion des Dihydrocortisols zum Tetrahydrocortisol. Mit Cytoplasma der Leber werden die Dihydro-Verbindungen mit gleicher Geschwindigkeit zu den entsprechenden Tetrahydro-Verbindungen reduziert.

Die Befunde sprechen dafür, daß der im Vergleich zum freien Cortisol langsamere Abbau des Cortisol-21-sulfates durch eine verzögerte Permeationsgeschwindigkeit des Cortisol-21-sulfates in die Zelle bedingt ist.

Die Befunde zur Hydrierung der Δ^4-3-Ketogruppe im Cortisol bzw. Cortisol-21-sulfat sprechen dafür, daß durch die Veresterung des Cortisols mit Schwefelsäure an der Hydroxygruppe in C_{21} die mikrosomale Δ^4-5α-Reduktion sowie die Reduktion durch die cytoplasmatischen Enzyme nicht beeinflußt wird, daß aber die mikrosomale 3β-ol-Reduktion gehemmt wird.

[1] Amamoo, D., 'Über den Einfluß anaboler C_{19}-Steroide auf den Corticosteron-Stoffwechsel der Ratte in vivo', Diss. (1968) an der Med. Fak. FU-Berlin

[2] Gerhards,E. et al. : unveröffentlichte Befunde

[3] Gerhards, E., Raspé, G. und Wiechert, R., 'Über Methyl-substituierte Steroide, IV', Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 17, 431 (1967)

[4] Linét, O. and Lomen, P., 'Effect of androgens and anabolic steroids on the plasma disappearance curve and the distribution of [1,2-^{3}H] corticosterone in the rat', Acta endocr. 68, 303 (1971)

[5] Ringold, H.J., 'Modification of hormonal activity by stereochemical and electronical alteration of the steroid molecule' in 'Mechanism of action of steroid hormones' ed. C.A.Villec u. L.L.Engel, Pergamon-Press 1961

[6] Schimassek, H., 'Metabolite des Kohlenhydratstoffwechsels der isoliert perfundierten Rattenleber', Biochem. Z. 336, 460 (1963)

[7] Schmidt-Thomé, J., Nesemann, G., Hübener, H.J. und Alester, I., '20β-Hydroxysteroiddehydrogenase, III', Biochem. Z. 336, 322 (1962)

[8] Schriefers, H., Scharlau, G. und Pohl, F., 'Corticosteroid-Umsatz und Corticosteroid-Produktion bei Ratten unter der Behandlung mit anabolen Steroiden ', Acta endocr. 48, 263 (1965)

[9] Schriefers, H., Pittel, M. und Pohl, F., 'Über den Einfluß des Ernährungszustandes der Ratte auf den Cortison- und Kohlenhydrat-Stoffwechsel in der Leber', Acta endocr. 40, 140 (1962)

[10] Schriefers, H. und Korus, W., 'Über die Kinetik des Stoffwechsels von Cortison, Prednison und 9α-Fluor-hydrocortison bei der Rattenleberperfusion', Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 318, 239 (1960)

[11] Schriefers, H., Herborn, U. und Pohl, F., 'Über den Einfluß des Alloxandiabetes auf den Cortison-Stoffwechsel in der Rattenleber' Acta endocr. 46, 89 (1964)

[12] Schriefers, H. und Korus, W., 'Zur Bestimmung von Corticoiden mit Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)', Naturwiss. 22, 517 (1956)

[13] Tamm, J., Voigt, K.D. und Volkwein, U., 'Water soluble steroid conjugates', Steroids 2, 271 (1963)

[14] Weichselbaum, Th.E.,Ph.D. and Margraf, H.W. 'Determination of Δ^4-3-keto-cortico-steroids in human peripheral plasma by the isonicotinic acid hydrazide (INH) reaction', J. clin. End. Metab. 17, 959 (1957)

[15] Vermeulen, A., 'Influence of anabolic steroids on secretion and metabolism of cortisol', in 'Structure and metabolism of cortico-steroids', Academic Press 1964, 109-116

[16] Vermeulen, A. and Ferin, J., 'The influence of 17α-methyl-19-nortestosteron (M.N.T.) on the metabolism of cortisol', Acta endocr. 39, 22 (1962)

[17] James, V.H.T., Landon, J. and Wynn, V., 'Effect of an anabolic steroid (methandienone) on the metabolism of cortisol in the human', J. Endocrin. 25, 211 (1962)

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Dr. Gerhards in den Forschungslaboratorien der Schering AG, Berlin/Bergkamen, durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Dr. Gerhards danke ich für die Überlassung des Themas sowie für wertvolle Gespräche und Anregungen.

Mein Dank gilt allen, die mir durch ihre Ratschläge die Arbeit erleichterten, ganz besonders Fräulein H. Otto.

lebenslauf

31.8.45	geburt in herzberg/elster
52	eintritt in die grundschule zu herzberg
53	flucht der familie nach westberlin, fortsetzung der grundschule in verschiedenen flüchtlingslagern der brd
56 bis 65	besuch des geschwister-scholl-gymnasiums in lünen, dort abitur
65/66	tätigkeit als schwesternhelferin in einer berliner belegklinik
66 bis 72	medizin-studium an der freien universität berlin, dort med. staatsexamen
seitdem	tätigkeit als medizinal-assistentin

difo-druck schmacht · bamberg